

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

**BAZI AĞIR METALLERİN TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE**  
**MİKROBİYAL BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

**Meral YÜCE**

Danışman Öğretim Üyesi  
**Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ**

ANKARA  
2011

Prof.Dr. Gönül DÖNMEZ danışmanlığında Meral YÜCE tarafından hazırlanan bu çalışma 08.09.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Başkan:**.....

*İmza:*

**Üye** :.....

*İmza:*

**Üye** :.....

*İmza:*

**Üye** :.....

*İmza:*

**Üye** :.....

*İmza:*

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

.....

**Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Sunulan tez çalışmasında *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhizopus arrhizus* ve *Pseudomonas aeruginosa* türleri, sıcaklıkla kurutulmuş ve/veya liyofilize edilmiş olmak üzere iki farklı formda ağır metal seçici biyosensör yapımında kullanılmışlardır. Mikroorganizmaların ilgili ağır metal için verdikleri yanıtlar Dönüşümlü voltametri (CV) ve Sıyırma voltametrisi (DPSV) olarak bilinen elektrokimyasal yöntemler kullanılarak belirlenmiş ve ağır metal tayini için optimum elektrokimyasal şartları elde etmek üzere; farklı elektrolit çözeltiler, pH, iyonik aralık, depozisyon potansiyeli, depozisyon süresi ve şartlandırma süresi gibi parametreler araştırılmıştır. Elektrokimyasal şartlar optimize edildikten sonra, her bir mikroorganizma için artan analit konsantrasyonuna karşı verdikleri akım cevabını gösteren kalibrasyon grafikleri elde edilmiş ve geliştirilen sensörlerin ortamda başka metallerin olması durumunda verdikleri elektrokimyasal cevapların değişimi de model çözeltiler kullanılarak araştırılmıştır.

Çalışmada *R. arrhizus* ve *P. aeruginosa* model solüsyonlardan Pb(II) tayini için, *R. mucilaginosa* ise Cu(II) tayini için araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *R. arrhizus* hücreleri Pb(II) tayininde *P. aeruginosa* hücrelerinden alınan elektrokimyasal cevapların hassasiyeti açısından daha etkili bulunmuştur. Pb(II) tayin limitleri sırasıyla *R. arrhizus* için  $0.02-2.5 \text{ mg.L}^{-1}$  ve *P.aeruginosa* için  $0.2-4.0 \text{ mg.L}^{-1}$  olarak bulunmuştur. *R. mucilaginosa* ile hazırlanan mikrobiyal sensörün Cu(II) için tayin aralığı ise  $0.0064-0.64 \text{ mg.L}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir. Mikrobiyal sensörlerin yüzey analizleri için taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır.

Geliştirilen sensörlerin pratik kullanımları, düşük tayin limitleri, hızlı ölçüm süreleri ve ekonomik seri üretime yatkın olmaları, sunulan tez çalışmasına konuyla ilgili gerçekleştirilmiş diğer çalışmalar arasında avantajlı bir konum kazandırmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Mikrobiyal biyosensör, Ağır metal tayini, Çevresel denetleme, Şartlandırma, Voltammetri

## ABSTRACT

In the presented dissertation, the microorganisms, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhizopus arrhizus* and *Pseudomonas aeruginosa* have been used as heat dried and/or lyophilized for construction of heavy metal selective biosensors. The responses obtained from microorganisms have been analyzed by using electrochemical techniques, which are known as Cyclic Voltammetry (CV) and Differential Pulse Stripping Voltammetry (DPSV). To get optimized electrochemical conditions from experiments, a number of different parameters have been performed, including electrolyte solutions, pH, ionic strength, deposition potential, deposition time and preconcentration time. After all electrochemical conditions were optimized, calibration graphs have been achieved, which showed the electrochemical responses of the microorganisms against increasing heavy metal concentrations. In addition to these, interference effects of other heavy metals on heavy metal detection have been also evaluated by using some model metal solutions.

In the study, *R. arrhizus* ve *P. aeruginosa* have been used for Pb(II) detection from model solutions and *R. mucilaginosa* have been investigated for Cu(II) detection. According to the results obtained, *R. arrhizus* was found more effective than *P. aeruginosa* for Pb(II) detection in terms of electrochemical sensitivity. Pb(II) detection range was found between 0.02-2.5 mg.L<sup>-1</sup> for *R. arrhizus* and 0.2-4.0 mg.L<sup>-1</sup> for *P.aeruginosa*. The microbial sensor prepared by using lyophilized *R. mucilaginosa* showed a detection range between 0.0064-0.64 mg.L<sup>-1</sup> for Cu(II). Scanning electron microscopy has been used to screen surface morphologies of the developed microbial sensors.

The developed microbial sensors are easy to use, and have low detection limits as well as short detection periods. They also tend to mass-produced economically. Aforementioned important features of the study give it an advantageous position among other similar studies.

**Key words:** Microbial biosensor, Heavy metal detection, Environmental Monitoring, Preconcentration, Voltammetry

## TEŞEKKÜR

*Hem Yüksek Lisans hem de doktora çalışmamın tüm aşamalarında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, çalışmalarımda yıllardır büyük emeği geçen Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi, değerli hocam, tez danışmanım, Sayın Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ' e,*

*Tezimin deneme aşamasında ve biçimlendirilmesinde çok önemli yardımlarını aldığım, değerli hocam, tez jürim, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın. Yrd. Doç. Dr. Hasan NAZIR' a,*

*Tezimin her aşamasıyla yakından ilgilenen, engin bilgi ve tecrübelerini esirgmeden paylaşan değerli jüri üyem, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Erol AKYILMAZ' a,*

*Yurt dışında kaldığım süre boyunca teorik ve pratik anlamda akademik yeteneklerimin gelişmesine çok kıymetli katkılarda bulunan ve bilime bakış açımı genişletip, zenginleştiren Cambridge Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Kimya Mühendisliği ve Biyoteknoloji Bölümü Öğretim Üyesi, Prof. Dr. Christopher R. LOWE (OBE)' a ve onun nezdinde Dr. Colin DAVIDSON, Dr. Graziella El KHOURY, Uzm. Penelope SHIHAB ve Uzm. Fatma Işık ÜSTOK' a,*

*Yüksek lisansımı olduğu gibi doktoramı çalışmamı da finansal olarak destekleyen ve iş bulmanın, hayatı kazanmanın gittikçe zorlaştığı günümüz Türkiye'sinde, çalışma ve yaşam şartlarımızı kolaylaştırarak bizleri bilimin ışığında yürümeye teşvik eden Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) ve değerli çalışanlarına,*

*Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve samimiyetlerini esirgemeyen sevgili hocalarım Yrd. Doç.Dr. Tuba Artan ONAT, Dr.Sevgi Ertuğrul KARATAY ve Dr. Nur Koçberber KILIÇ' a, değerli laboratuvar arkadaşlarım, dostlarım Dr. Hale AMINFARZANEH, Uzm. Nalan Oya SAN ve Uzm. Pınar KARACAKAYA' ya,*

*Gösterdikleri emsalsiz sabır, ilgi ve hoşgörüden dolayı annem ZELİHA YÜCE ve babam RAMAZAN YÜCE' ye ve onların nezdinde tüm YÜCE ailesine,*

*Başarımda katkısı bulunan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.*

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ÖZET .....   | i    |
| ABSTRACT .....   | ii   |
| TEŞEKKÜR .....   | iii  |
| İÇİNDEKİLER.....   | iv   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                      | ix   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                     | xi   |
| SİMGELER DİZİNİ .....                                      | xii  |
| KISALTMALAR .....  | xiii |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....                                      | 1    |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....                            | 3    |
| 2.1. Elektrokimya .....                                    | 3    |
| 2.1.1. Elektrokimyanın tanımı ve kullanım alanları .....   | 3    |
| 2.1.2. Elektrokimyasal hücreler .....                      | 3    |
| 2.1.3. Elektrokimyasal hücrelerde gözlenen süreçler .....  | 5    |
| 2.1.4. Elektrokimyada kullanılan elektrotlar .....         | 5    |
| 2.1.4.1. Referans elektrotlar.....                         | 6    |
| 2.1.4.2. Yardımcı/ karşıt elektrotlar.....                 | 6    |
| 2.1.4.3. Çalışma elektrotları.....                         | 7    |
| 2.1.5. Voltametri.....                                     | 8    |
| 2.1.5.1. Voltametri tarihi ve prensipleri.....             | 8    |
| 2.1.5.2. Voltametricide kullanılan uyarma sinyalleri ..... | 9    |
| 2.1.5.3. Sıyırma yöntemleri .....                          | 11   |
| 2.1.5.4. Artık akımlar .....                               | 12   |
| 2.2. Biyosensörler .....                                   | 15   |
| 2.2.1. Tanımı ve tarihçesi .....                           | 15   |
| 2.2.2. Biyosensörün temel bileşenleri.....                 | 16   |
| 2.2.2.1. Biyolojik kısım veya tanıyıcı kısım.....          | 16   |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.2.2. Çevirici kısım .....   | 17        |
| 2.2.3. Biyosensörlerin genel uygulama alanları .....                                  | 18        |
| 2.2.4. Biyosensör tipleri.....  | 18        |
| 2.2.4.1. Elektrokimyasal biyosensörler .....  | 18        |
| 2.2.4.2. Optik biyosensörler.....   | 19        |
| 2.2.4.3. Termal biyosensörler .....   | 20        |
| 2.2.4.4. Kütle hassas biyosensörler .....   | 20        |
| 2.2.5. İdeal biyosensörlerin temel özellikleri .....                                  | 20        |
| 2.2.6. Biyosensörlerin avantajları ve dezavantajları.....                             | 23        |
| 2.2.7. Mikrobiyal biyosensörler.....  | 25        |
| 2.3. Ağır Metaller .....  | 26        |
| 2.3.1. Ağır metaller ve çevre kirliliği .....   | 26        |
| 2.3.2. Ağır metallerin canlılar üzerindeki etkileri .....                             | 27        |
| 2.3.3. Ağır metal tayin yöntemleri.....   | 32        |
| 2.3.4. Mikroorganizmaların ağır metalleri bağlama özellikleri.....                    | 33        |
| 2.4. Çevresel Sorunları Denetlemek Üzere Geliştirilen Bazı Mikrobiyal Sensörler ..... | 37        |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....  | <b>45</b> |
| 3.1. Materyal.....  | 45        |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....   | 45        |
| 3.1.2. Kullanılan mikrobiyolojik materyaller .....                                    | 47        |
| 3.1.3. Kullanılan cihazlar ve teçhizatlar .....                                       | 48        |
| 3.2. Yöntem .....   | 51        |
| 3.2.1. Destek elektrolit çözeltilerinin hazırlanması .....                            | 51        |
| 3.2.1.1. Amonyak çözeltisi .....  | 51        |
| 3.2.1.2. Asetat tampon çözeltisi.....   | 51        |
| 3.2.1.3. Tris hidroklorik asit (Tris-HCl) tampon çözeltisi.....                       | 51        |
| 3.2.1.4. Sodyum nitrat çözeltisi .....  | 52        |
| 3.2.1.5. Hidroklorik asit çözeltisi .....   | 52        |
| 3.2.1.6. Nitrik asit çözeltisi.....   | 52        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.2. Ağır metal solüsyonlarının hazırlanması.....   | 52        |
| 3.2.3. Mikrobiyolojik materyallerin hazırlanması.....   | 53        |
| 3.2.3.1. <i>R. mucilaginosa</i> 'nın hazırlanması.....  | 53        |
| 3.2.3.2. <i>R. arrhizus</i> 'un hazırlanması.....   | 53        |
| 3.2.3.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın hazırlanması.....  | 54        |
| 3.2.4. Karbon pastasının hazırlanması.....  | 54        |
| 3.2.5. Çalışma elektrotlarının hazırlanması.....  | 55        |
| 3.2.6. Analiz yöntemleri.....   | 55        |
| 3.2.6.1. Mikroorganizmaların gelişimlerinin belirlenmesi.....   | 55        |
| 3.2.6.2. Dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar.....  | 56        |
| 3.2.6.3. Sıyırma voltametrisi tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar.....  | 57        |
| 3.2.6.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan çalışmalar.....   | 58        |
| 3.2.7. Elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisi araştırılan faktörler.....   | 59        |
| 3.2.7.1. Tarama hızı.....   | 59        |
| 3.2.7.2. Destek elektrolit çözeltileri.....   | 59        |
| 3.2.7.3. Destek elektrolit çözeltisi pH' sı.....  | 60        |
| 3.2.7.4. Destek elektrolit çözeltisinin konsantrasyonu.....   | 61        |
| 3.2.7.5. Şartlandırma süresi.....   | 61        |
| 3.2.7.6. Deposizyon potansiyeli.....  | 61        |
| 3.2.7.7. Deposizyon süresi.....   | 62        |
| 3.2.7.8. Farklı ağır metallerin girişim etkileri.....   | 62        |
| 3.2.8. Kalibrasyon eğrilerinin elde edilmesi.....   | 64        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>  | <b>65</b> |
| 4.1. <i>R. mucilaginosa</i> Kullanılarak Geliştirilen Mikrobiyal Biyosensör için Araştırma Bulguları.....                   | 65        |
| 4.1.1. CPE kullanılarak Cu(II) içeren şartlandırma ortamlarında dönüşümlü voltametri çalışmalarının gerçekleştirilmesi..... | 65        |
| 4.1.2. Modifiye edilmiş ve bakırlı ortamda şartlandırılmış elektrodun SEM ile yüzey analizi.....                            | 66        |
| 4.1.3.Şartlandırma zamanının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi.....                                      | 68        |



|  |    |
|--|----|
| 4.1.4.Tarama hızının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi.....   | 70 |
| 4.1.5.Şartlandırma çözeltisinin pH' sının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi .....                         | 71 |
| 4.1.6.Geliştirilen model sensöre ait kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi .....  | 72 |
| 4.1.7.Farklı ağır metallerin Cu(II) tayini üzerindeki tekli ve birlikte etkilerinin belirlenmesi .....                       | 73 |
| 4.2. <i>R. arrhizus</i> Kullanılarak Geliştirilen Mikrobiyal Biyosensör İçin Araştırma Bulguları .....                       | 76 |
| 4.2.1. CPE kullanılarak Pb(II) içeren şartlandırma ortamlarında dönüşümlü voltametri çalışmalarının gerçekleştirilmesi ..... | 76 |
| 4.2.2. Modifiye edilmiş ve kurşun içeren solüsyonda şartlandırılmış elektrodun SEM ile yüzey analizi .....                   | 77 |
| 4.2.3.Destek elektrolit çözeltisinin ve iyonik aralığın elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin araştırılması.....           | 79 |
| 4.2.4.Şartlandırma çözeltisi pH' sının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi .....                            | 81 |
| 4.2.6.Depozisyon/Çöktürme potansiyelinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin araştırılması .....                         | 83 |
| 4.2.7.Geliştirilen model sensöre ait kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi .....  | 83 |
| 4.2.8.Farklı ağır metallerin Pb(II) kurşun tayini üzerindeki girişim etkilerinin araştırılması .....                         | 84 |
| 4.3. <i>P. aeruginosa</i> Kullanılarak Geliştirilen Mikrobiyal Biyosensör için Araştırma Bulguları .....                     | 87 |
| 4.3.1. CPE kullanılarak Pb(II) içeren şartlandırma ortamlarında dönüşümlü voltametri çalışmalarının gerçekleştirilmesi ..... | 87 |
| 4.3.2.Destek elektrolit çözeltisinin ve iyonik aralığın elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin araştırılması.....           | 88 |
| 4.3.3.Şartlandırma çözeltisi pH' sının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi .....                            | 90 |
| 4.3.4.Şartlandırma zamanının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi.....                                       | 91 |
| 4.3.5.Depozisyon/çöktürme potansiyelinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin araştırılması .....                         | 92 |
| 4.3.6.Depozisyon/Çöktürme süresinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin araştırılması .....                              | 93 |
| 4.3.7.Geliştirilen model sensöre ait kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi .....  | 93 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.3.8.Farklı ağır metallerin Pb(II) tayini üzerindeki girişim etkilerinin araştırılması ..... | 94  |
| <b>5.TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....  | 96  |
| KAYNAKLAR.....  | 103 |
| ÖZGEÇMİŞ.....   | 111 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Basit bir elektrokimyasal hücrenin şematik gösterimi

Şekil 2.2 Karbon pasta elektrodunun şematik gösterimi

Şekil 2.3 Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayınımları

Şekil 2.4 Kanda bulunan kurşun miktarına bağlı olarak ortaya çıkan fonksiyon bozuklukları

Şekil 2.5. Ağır metallerin insan vücudundaki etki mekanizması

Şekil 2.6. Unisense nitrat biyosensörü

Şekil 4.1 Modifiye edilmiş (a) ve edilmemiş (b) CPE elektrotlarının dönüşümlü voltamogramları (Cu(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-3}$  M, ölçüm çözeltisi: 0.05 M NaNO<sub>3</sub>, tarama hızı: 100 mV/sn, şartlandırma zamanı: 15 dk, yöntem: CV)

Şekil 4.2 *R. mucilaginosa* ile modifiye edilen elektrodun x3500 (a) ve x35.000 (b) büyütme ile çekilmiş SEM görüntüleri

Şekil 4.3 Şartlandırma süresinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

Şekil 4.4 Şartlandırma süresinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

Şekil 4.5 Tarama hızının voltametrik tayin üzerine etkisi (Cu(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-3}$  M, ölçüm çözeltisi: 0.05 M NaNO<sub>3</sub>, yöntem: CV)

Şekil 4.6. Şartlandırma çözeltisinin pH'ının elektrokimyasal tayin üzerine etkisi (Cu(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-3}$  M, ölçüm çözeltisi: 0.05 M NaNO<sub>3</sub>, şartlandırma süresi: 15 dk, tarama hızı: 100 mV/s, yöntem: DPSV)

Şekil 4.7 Geliştirilen model sensöre ait optimum koşullarda elde edilmiş kalibrasyon doğrusu (Cu(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-7}$ – $1.0 \times 10^{-5}$  M, şartlandırma süresi: 15 dk, ölçüm çözeltisi: 0.05 M NaNO<sub>3</sub>, pH: 5.0, yöntem: DPSV)

Şekil 4.8. Farklı metallerin mikrobiyal sensörün bakır tayini üzerine tekli etkileri (Cu konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-6}$  M, şartlandırma süresi: 15 dk, ölçüm çözeltisi: 0.05 M NaNO<sub>3</sub>, pH: 5.0, DPSV)

Şekil 4.9 Farklı metallerin mikrobiyal sensörün bakır tayini üzerine birlikte etkileri (Metal konsantrasyonları: a)  $1.0 \times 10^{-6}$  M, b)  $5.0 \times 10^{-6}$  M, şartlandırma süresi: 15 dk, ölçüm çözeltisi: 0.05 M NaNO<sub>3</sub>, pH: 5.0, yöntem: DPSV)

Şekil 4.10 Modifiye edilmiş ve edilmemiş CP elektrotlarının dönüşümlü voltamogramları (Pb(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-4}$  M, ölçüm çözeltisi: 0.01 M Tris-HCl, tarama hızı: 50 mV/sn, şartlandırma zamanı: 15 dk, yöntem: CV)

Şekil 4.11 Modifiye edilmemiş (a) ve *R. arrhizus* ile modifiye edilmiş (b) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri

Şekil 4.12 İyonik aralığın elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

**Şekil 4.13** Şartlandırma çözeltisinin pH'ının elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

**Şekil 4.14** Şartlandırma zamanının elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

**Şekil 4.15** Çöktürme potansiyelinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

**Şekil 4.16** Optimum şartlarda elde edilmiş kalibrasyon doğrusu

**Şekil 4.17** Farklı metallerin Pb(II) cevabı üzerine tekli etkileri

**Şekil 4.18** Farklı metallerin Pb(II) cevabı üzerine birlikte etkileri

**Şekil 4.19** Modifiye edilmiş (a) ve edilmemiş (b) CPE elektrotlarının dönüşümlü voltamogramları (Pb(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-4}$  M, ölçüm çözeltisi: 0.05 M sodyum asetat tamponu, tarama hızı: 80 mV/sn, şartlandırma zamanı: 15 dk, yöntem: DPSV)

**Şekil 4.20** İyonik aralığın elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

**Şekil 4.21** Şartlandırma çözeltisinin pH'ının elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

**Şekil 4.22** Şartlandırma süresinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

**Şekil 4.23** Depozisyon potansiyelinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

**Şekil 4.24** Depozisyon süresinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

**Şekil 4.25** Optimum şartlarda elde edilmiş kalibrasyon doğrusu

## ÇİZELGELER DİZİNİ

**Çizelge 2.1** Metal biyosorbsiyonunda kullanılan bazı mikroorganizmalar

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan mikrobiyal türlerin bilimsel sınıflandırılmaları

**Çizelge 4.1** *R. mucilaginosa* ile modifiye edilen elektroda ait elementel analiz sonuçları

**Çizelge 4.2** Elementel analiz sonuçları

**Çizelge 4.3** Farklı elektrolit çözeltilerinin pik akımı üzerindeki etkisi

**Çizelge 4.4** Farklı ağır metallerin kurşun tayini üzerindeki girişim etkilerinin araştırılması

**Çizelge 5.1** Literatürdeki bazı Cu(II) sensörlerinin analitik ve teknik özellikleri

**Çizelge 5.2** Bazı ağır metallerin iyonik çapları ve elektronegatiflik değerleri

**Çizelge 5.3** Literatürdeki bazı Pb(II) sensörlerinin analitik ve teknik özellikleri

## SİMGELER DİZİNİ

HCl: Hidroklorik asit

NaCl: Sodyum klorür

CH<sub>3</sub>COOH: Asetik asit

NaOH: Sodyum hidroksit

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Amonyum sülfat

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Potasyum fosfat

AgCl: Gümüş klorür

Cr: Krom

Cu: Bakır

Ni: Nikel

Cd: Kadmiyum

Pb: Kurşun

Zn: Çinko

Ag: Gümüş

μM: Mikromolar

μV: Mikrovolt

## **KISALTMALAR**

|       |  |
|-------|--|
| CPE:  | Karbon pasta elektrodu                 |
| CV:   | Dönüşümlü voltametri                   |
| DPSV: | Diferansiyel puls sıyırma voltametrisi |
| NA:   | Nutrient agar                          |
| NB:   | Nutrient broth                         |
| OD:   | Optik yoğunluk                         |
| PDA:  | Patates dekstroz agar                  |
| SEM:  | Taramalı elektron mikroskobu           |
| YPG:  | Yeast pepton glukoz                    |

## 1. GİRİŞ

Günümüzde çevre kirliliği geleceğimizi tehdit altında bırakan önemli sorunlardan biri haline gelmiştir. Su kirliliği ise çevre kirliliğinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Sanayileşmenin giderek artmasıyla birlikte, doğada kendi kendini temizleme olarak bilinen süreç, atık suyun temizlenerek yeniden kullanımını imkânsız kılmakta ve dolayısı ile atıksuların arıtımında yeni teknolojilerin oluşturulması ve geliştirilmesiyle ilgili çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Tekstil, deri, boya, metal ve kâğıt endüstrilerinden kaynaklanan atıksular fazla miktarda ağır metal içermektedir. Bu tip atıksuların arıtılmadan kontrolsüz bir şekilde çevreye boşaltılmaları, o çevredeki canlılara toksik ve mutajenik etki yapmaktadır. Gümüş, alüminyum, altın, kadmiyum, kurşun, arsenik ve civa gibi metallerin biyolojik önemi bulunmamakla birlikte hücrede düşük konsantrasyonda bile bulunmaları tehlikeli olmaktadır, bu nedenlerden dolayı ağır metal içeren endüstriyel atıksulardan öncelikle bu ağır metallerin uzaklaştırılması gerekmektedir (Malik et al. 2004, Nies 2003, Bruins et al. 2000)

Ağır metallerin tayininde genellikle spektroskopik, voltametrik ya da kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler düşük konsantrasyonlardaki elementleri tayin edebilmelerine rağmen insitü analizler için uygun değildir. Ağır metalleri tayin etmek üzere bugüne kadar farklı enzim ve biyosensör tiplerinin kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır (Alpat et al. 2008).

Biyosensörler diğer analiz yöntemleri ile yarış içindedir, çünkü diğer geleneksel tekniklere göre daha fazla avantaj sağlarlar (Petanen ve Romantschuk 2002). Biyosensörlerin yüksek spesifiklik yanında renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır (Telefoncu 1999). Biyolojik algılayıcı elementlerinin seçiciliği, örnek ön hazırlığına ve fazla miktarda örneğe bağlı kalmaksızın kompleks karışımlarda gerçek zamanlı analiz için çok yüksek spesifiklikte cihazların geliştirilmesine elverişlidir. Biyosensörler ayrıca düşük maliyete ve basit kullanıma sahip, çoğaltılabilir analitik cihazlardır (Flynn et al. 2002, Turpeinen et al. 2003, Velasco-Garcia ve Mottram 2003, Petanen and Romantschuk 2003).



Yüksek spesifliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Enzim biyosensörleri enzim aktivitesinin metallere inhibisyonu temeline dayanırlar ve kirleticilerin dolaylı tayinini sağlarlar (Cowell vd. 1995; Rodriguez vd. 2004). Saflaştırılmış enzimler substrat veya inhibitör tespiti için çok yüksek spesifiteye sahip olmalarına rağmen, enzim saflaştırmanın pahalı olması ve uzun sürmesi, kofaktör veya koenzim ihtiyacı, bazen birden fazla enzime ihtiyaç duyulması gibi nedenlerden dolayı önemli dezavantajları da beraberlerinde getirmektedirler. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması veya birden çok maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri ve tercihen mikroorganizmalar bu durumlarda ideal alternatifler olmaktadır (Arikawa vd. 1998). Geniş çapta kimyasal maddeleri tespit edebilmeleri, genetik olarak değiştirilmeye yatkın olmaları, değişik sıcaklık ve pH aralıklarında çalışmaya elverişli olmaları mikrobiyal sensörlerin en önemli avantajları arasındadır (Mulchandani ve Rogers 1998).

Mikrobiyal sensörler tıp, gıda güvenliği, biyogüvenlik, çevresel denetlemeler gibi değişik alanlarda hedef analitin tayini için kullanılabilirler. İlk olarak tasarlanan mikrobiyal sensörlerde mikroorganizmaların metabolik fonksiyonlarından ve solunumla ilgili enzimlerinden faydalanılarak, bu sistemlerin substratları veya inhibitörleri tayin edilmekteydi. Günümüzde ise genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalarla toksisitenin ve kirletici maddelerin biyolojik olarak tespitini sağlamaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Lei vd. 2006). Mikrobiyal biyosensörlerin kullanımı ile ilgili birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen bunların çok az bir kısmı ağır metal iyonlarının tayini ile ilgilidir. Bunların içinde de yine az bir kısmında mikroorganizmalar genetik modifikasyona uğratılmadan doğrudan olarak biyosensör tasarımında kullanılmışlardır.

## **2. KAYNAK ÖZETLERİ**

### **2.1. Elektrokimya**

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesini ve bunun sonucunda oluşan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalıdır.

#### **2.1.1. Elektrokimyanın tanımı ve kullanım alanları**

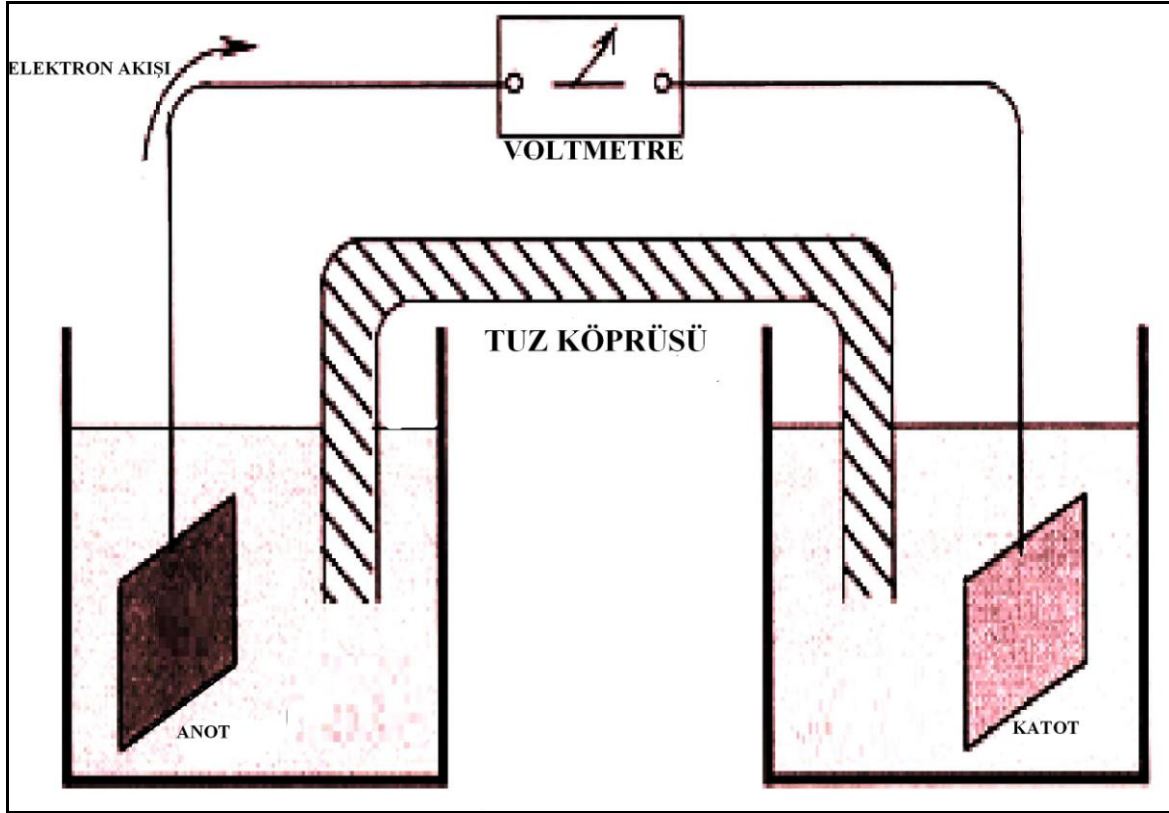
Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi için, incelenen maddeyi içeren bir çözelti, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı bir elektrot sistemi ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir çevirim sistemi gereklidir. Çözelti olarak elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla elektrolitik çözelti kullanılır. Birçok elektrokimyasal yöntemde, çözeltiliye elektriksel sinyal uygulanarak çözeltinin farklı bir özelliği ölçülür. Bazı metallerin saf şekilde elde edilmeleri veya yüzeylerinin başka bir metalle kaplanması da elektrokimyasal yöntemlerle yapılır.

Elektrokimya pratikte büyük öneme sahip bir çalışma alanıdır. Piller, akümülatörler kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine dönüştüren elektrokimyasal düzeneklerdir ve günlük hayatımızda çok çeşitli amaçlar için elektrik enerjisi kaynağı olarak kullanılmaktadırlar.

#### **2.1.2. Elektrokimyasal hücreler**

Kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine dönüştüren düzeneklere elektrokimyasal hücre veya pil denir. Elektro-kimyasal ölçümlerin (akım, potansiyel, iletkenlik ölçümleri vb.) ve elektro-kimyasal işlemlerin (elektro-depozisyon, sıyırma, korozyon) gerçekleştirildiği bu hücreler, cam veya inert malzemelerden (polimerler, teflon vb.) üretilirler. Hacimleri 10-20 ml arasında değişir ve ortam olarak iletken tampon çözeltiler içerirler. Elektrokimyasal

hücreler basit olarak laboratuvar koşullarında hazırlanabilirler veya satın alınırlar. Bir elektrokimyasal hücrenin (pil) basit bir şekli Şekil 2.1' de verilmiştir.



Şekil 2.1 Basit bir elektrokimyasal hücrenin şematik gösterimi

Bir elektrokimyasal hücre (pil) yarı-reaksiyonların yürüdüğü yarı hücreler, tuz köprüsü ve yarı hücreleri dıştan bağlayan bir iletken oluşur. Elektrik akımı sulu çözeltilerde iyonlar tarafından, metallerde (örneğin bir telde) ise elektronlar tarafından taşınır. Yarı hücrelerde bir elektrot ve elektrotun daldırıldığı bir elektrolit bulunur. Tuz köprüsü, elektrokimyasal reaksiyon sırasında yarı-reaksiyon nedeniyle yarı hücrelerdeki yük denkliliğinin bozulmamasını sağlar. Dış iletken ise yükseltgenmenin olduğu yarı hücredeki elektronları indirgenmenin olduğu yarı hücreye iletir. Yükseltgenmenin gerçekleştiği yarı hücredeki elektrot "anot", indirgenmenin gerçekleştiği yarı hücredeki elektrot "katot" olarak adlandırılır.

Bir elektrokimyasal hücre, kendiliğinden gelişen bir redoks reaksiyonunun ortaya çıkardığı enerjiden elektrik akımı üretebilen bir cihazdır.

### 2.1.3. Elektrokimyasal hücrelerde gözlenen süreçler

Elektrokimyasal tepkimeler esnasında elektrotlarda iki farklı süreç gerçekleşir. Birincisinde, elektrot-çözelti ara yüzeyinden yük geçişi yapılarak yükseltgenme veya indirgenme gerçekleşir. Bu tür süreçlere *faradayik süreçler* denir. *Faradayik akım* ( $I_f$ ) analiz edilecek maddeden yani reaksiyondan kaynaklanan akımdır.

Bazı durumlarda ise elektrot, yük geçişinin gerçekleşmediği potansiyel aralığında bulunabilir. Fakat adsorbsiyon gibi bazı işlemler gerçekleşerek, elektrot-çözelti ara yüzeyinin yapısında değişikliğe yol açabilirler. Böylece akım değerlerinde değişiklik gözlenir. Bu şekilde yük geçişine bağlı olmayan süreçlere de *faradayik olmayan süreçler* denir. Bu tür süreçlere en iyi örnek *kapasitif akım*dır. *Kapasitif akım*, elektrot-çözelti ara yüzeyinin iki kenarında, potansiyel uygulandığı anda, karşıt yüklerin dizilmesi ile oluşan akımdır. Elektrolit çözeltisine bir elektrodun daldırılması ve negatif yükle yüklenmesi sonucu çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilirler. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin ara yüzeyin her iki yanında birikmesi ile bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşur. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa bile bir akım oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir; sistemden kaynaklanır ve *kapasitif akım* ( $I_c$ ) adını alır. *Kapasitif akım* ne kadar düşük olursa, yapılan ölçüm o kadar doğrudur.

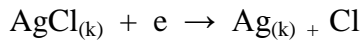
### 2.1.4. Elektrokimyada kullanılan elektrotlar

Elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış iki veya üç elektrot içerir. Elektrokimyasal yöntemlerde kullanılan elektrot sistemine ikili veya üçlü elektrot sistemi adı verilir. İkili elektrot sistemi bir çalışma ve bir karşıt elektrottan oluşurken, üçlü elektrot sistemlerinde ilave olarak bir referans elektrot mevcuttur. Bazen elektrot terimi tüm yarı hücre için de kullanılır. Bir pilde elektronların üretildiği elektrot yani anot eksi (-) uç, elektronların tüketildiği yer yani katot artı (+) uçtur.

#### 2.1.4.1. Referans elektrotlar

Elektrokimyasal uygulamalar sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeyen, sabit kalan ve çalışılan çözeltinin bileşiminden etkilenmeyen elektrotlardır. Bir referans elektrot kolayca hazırlanabilmeli, potansiyelinin sıcaklıkla değişim katsayısı çok düşük olmalı, belli bir akım aralığında tersinir davranmalı yani içinden küçük akımlar geçtiğinde dahi gerilimi sabit kalmalıdır. Bu koşullar dikkate alındığında, civa ve gümüş gibi bir metal ile o metalin az çözünen bir tuzundan yapılmış elektrotların referans elektrot olarak kullanılabilirdiği görülmüştür.

*Gümüş- gümüş klorür referans elektrot (Ag/ AgCl):* Gümüş bir telin, elektrolitik yoldan Gümüş klorür (AgCl) ile kaplanarak klor iyonu içeren bir çözeltiliye daldırılmasıyla elde edilen bir elektrottur. Bu elektrodun yarı tepkimesi aşağıda verildiği gibidir.



Doygun potasyum klorür (KCl) çözeltisi kullanıldığı zaman, bu elektrodun standart hidrojen elektroduna göre potansiyeli, +0.222 V' dur.

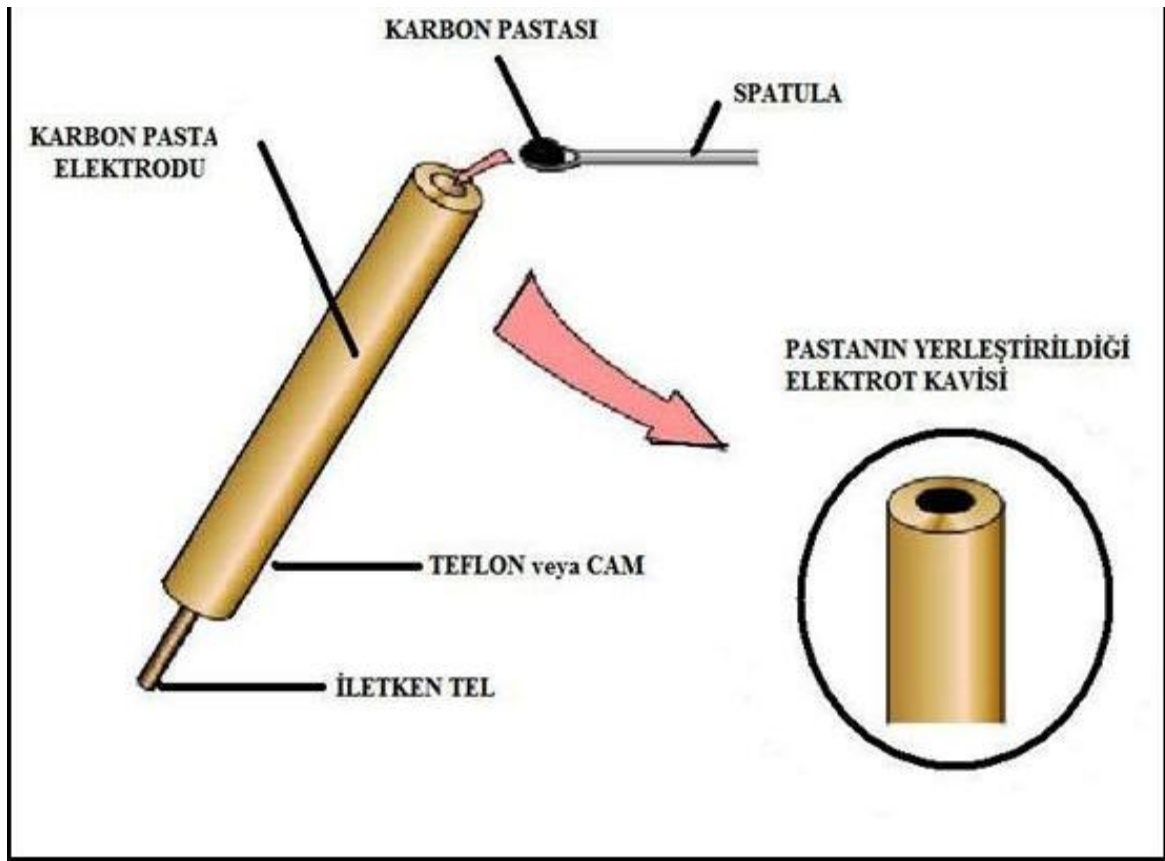
#### 2.1.4.2. Karşıt/ yardımcı elektrotlar

Karşıt elektrodun görevi çalışma elektrodu ile referans elektrodu arasına uygulanan gerilim farkının güvenceye alınmasıdır. Potansiyel, referans ve çalışma elektrotları arasına uygulanmakta ve yardımcı elektrodun varlığı ile sabit kalmaktadır. Akım çalışma elektrodundan yardımcı elektroda doğru akmaktadır.

Yardımcı elektrot helezon şeklinde kıvrılmış platin bir tel veya bir civa havuzu şeklinde olan ve elektriğin çözelti içinden çalışma elektroduna aktarılmasını sağlayan karşıt elektrottur. Bu elektrot inert olup ölçülen sonuçlar üzerinde etkiye sahip değildir.

### 2.1.4.3. Çalışma elektrotları

Bu elektrot, yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur. Çalışma elektrodu çeşitli şekil ve büyüklükte olup, yapımında kullanılan iletken malzeme platin ya da altın gibi inert bir metal; karbon, pirolitik grafit ya da camsı karbon; kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal olabilir. Bu tür elektrotların kullanıldığı potansiyel aralığı sadece elektrot malzemesine değil, aynı zamanda bu elektrotların daldırıldığı çözeltinin bileşimine bağlı olarak da değişir. Çalışma elektrotlarında, kullanılan çalışma ortamına göre seçilen potansiyel çalışma aralıkları; örneğin civa elektrodu için 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çalışma ortamında (-0.8)-(+0.4) V aralığı ve 1 M KCl ortamında (-1.6) ile (+0.2) V aralığıdır.



Şekil 2.2. Karbon pastası elektrodunun şematik gösterimi

*Karbon pasta çalışma elektrodu (CPE):* Karbon pastası elektrodu kısa zamanda kolayca hazırlanabilen, geniş potansiyel aralıklarında çalışmaya olanak sağlayan, düşük maliyetli

bir çalışma elektrodudur (Adams 1958). Civa elektroduna kıyasla çalışma aralığı daha geniş olup, toksik bir metalin varlığına dayanmaz. Potansiyel çalışma aralığı 1 M HClO<sub>4</sub> ortamında (-1.6) ile (+0.2) V' dur. Şekil 2.2' de bir karbon pastası elektrotunun şematik hali gösterilmiştir.

Bu elektrot genel olarak %70 grafit tozu ve %30 mineral yağ karışımından oluşan karbon pastası karışımının, 2-5 mm çapında cam veya teflon boruların içerisine yerleştirilmesiyle hazırlanır. Diğer uçtan elektriksel iletkenliği sağlamak için iletken bir tel (örneğin pirinç), borunun 2/3' üne kadar yerleştirilir. Elektrodun yüzeyi yumuşak ve kaygan bir zemine sürtülerek düzleştirilir ve parlatılır. Hazırlanan pasta karışımına değişik kimyasal veya biyolojik katalizörlerin eklenmesine göre karbon pastası modifiye edilebilir.

### **2.1.5. Voltametri**

Voltametrde polarize olmuş çalışma elektrodunda, akım, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülür. Diğer bir deyişle voltametri, tam derişim polarizasyonu koşulu altında bir elektrokimyasal hücrede oluşan akımın ölçülmesi esasına dayanan elektrokimyasal bir yöntemdir. Genel olarak voltametrde kullanılan çalışma elektrotları, polarizasyonu arttırmak için, yüzey alanları çoğunlukla birkaç milimetre kare ve bazı uygulamalarda ise birkaç mikrometre veya daha küçük olan mikro elektrotlardır.

#### **2.1.5.1. Voltametri tarihi ve prensipleri**

Tarihsel olarak, Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920' lerin başında geliştirilen ve voltametrinin özel bir tipi olan polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir. Voltametri inorganik, fiziko ve biyokimyacılarla çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorbif işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde oluşan elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi amaçlar için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Voltametrizde çalışma elektrodunu içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin temelini teşkil eden özgün akım yanıtları oluşturur.

### **2.1.5.2. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri**

Voltametrizde çalışma elektrodu içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin temelini oluşturan karakteristik akım cevapları oluşturur. Uyarma sinyalinin çeşidine göre voltametrik yöntemler dört başlık altında incelenebilir:

*Doğrusal taramalı voltametri (DTV):* Elektrokimyasal hücreye uygulanan doğru akım (dc) potansiyeli zamanın fonksiyonu olarak doğrusal bir şekilde arttırılır. Bu sırada hücrede oluşan akım, zamanın (dolayısıyla uygulanan potansiyelin) bir fonksiyonu olarak kaydedilir ve voltamogram denilen grafikler elde edilir.

*Diferansiyel puls voltametrisi (DPV):* Bu yöntemde uyarma sinyali, periyodik bir darbenin doğrusal bir tarama sırasında oluşturulmasıyla elde edilir. Bu yöntemin önemli bir avantajı, yarı-dalga potansiyelleri arasında yaklaşık 0.005 V fark olan maddeler için bile özgün pik maksimumunun elde edilmesidir. Buna karşın DTV' de yarı-dalga potansiyel farkı en az 0.2 V olmalıdır, eğer bu farka ulaşamazsa voltamogramlarda iyi pik maksimumları elde edilemez. DPV ' nin tayin sınırı, DTV' nin tayin sınırından 100-1000 kat daha düşük olup  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  M aralığındadır. DPV' nin tayin duyarlılığının daha yüksek olmasının nedeni *faradayik akımın en yüksek, faradayik olmayan kapasitif akımın en düşük olduğu anda ölçüm yapmasıdır.*

*Kare dalga voltametrisi (KDV):* Hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü taşıyan bir darbe voltametri yöntemidir. Bu yöntemde voltamogramın tamamı 10 milisaniyeden daha kısa sürede elde edilir. KDV asılı civa damla elektrodu, katı elektrotlar veya kromatografik detektörler ile kullanılabilir. Uyarma sinyali, darbenin basamak sinyali üzerine bindirilmesi ile elde edilir. Basamaklı sinyalde, her basamağın boyu ve darbe periyodu eşit



olup yaklaşık 5 ms' dir. Kare dalga voltamogramları elde etmek için, ileri darbe akım ve geri darbe akımın farkı, potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Tayin sınırı  $10^{-7}$   $10^{-8}$  M aralığındadır.

*Dönüşümlü voltametri (DV/CV):* Çeşitli koşullar altında yükseltgenme indirgenme tepkimelerinin mekanizmaları hakkında bilgi veren bir tanı aracı olarak önemli bir uygulama alanı bulmuştur. Fakat nicel analizlerle ilgili uygulamaları sınırlıdır. Yöntemin, uyarma sinyalinin şeklinden kaynaklanan bir diğer adı da üçgen dalga voltametrisidir. DV' de durgun çözeltide, sabit hızda potansiyel, başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doğru pozitif veya negatif yönde taranır. Daha sonra taramanın yönü değiştirilerek gene aynı tarama hızıyla ilk potansiyele kadar tarama yapılır. Bu sırada elektrot tepkimeleri sonucu ortaya çıkan akım, taranan potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen eğrilere dönüşümlü voltamogram denir. ,

Bir dönüşümlü voltamogramın en önemli parametreleri, katodik pik potansiyeli, anodik pik potansiyeli, katodik pik akımı ve anodik pik akımıdır. Tersinir bir elektrot için anodik ve katodik pik akımları mutlak değerce yaklaşık birbirine eşit, fakat zıt yönlüdür. Pik potansiyellerinin farkı  $0.0592/n'$  dir. Burada  $n$ , yarı reaksiyonda yer alan elektron sayısıdır.

Dönüşümlü voltametrimin bir araç olarak başlıca kullanım alanı, çeşitli şartlar altında elektrokimyasal işlemler hakkında kantitatif bilgiler sağlayan temel ve teşhise dayalı çalışmalardır. Rutin kantitatif işlemlerde kullanılmadığı halde, özellikle organik ve metalo-organik sistemlerde yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin mekanizma ve hız çalışmaları için önemli bir araçtır. Bu yöntem, normal olarak elektrokimyasal olarak belirtilebilen bir sistemin araştırılması için seçilen ilk tekniktir. Dönüşümlü voltametri miktar tayinine yönelik bir yöntem değildir ama analiz edilecek maddenin hangi potansiyelde nasıl davrandığı hakkında bilgi verir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda o maddenin hangi potansiyelde optimum cevabı verebileceğini gösterir. Böylece miktar tayininde kullanılacak yöntem için ön hazırlık evresini oluşturur. Dönüşümlü voltametri çalışılan potansiyel aralığının yanı sıra uygulanan tarama hızının ve kaç defa tarama yapıldığının da etkisi vardır.

### 2.1.5.3. Sıyırma yöntemleri

Sıyırma yöntemlerinde analiz edilecek madde genellikle karıştırılan bir çözeltide öncelikle elektrot yüzeyine biriktirilir. Normal olarak elektro-biriktirme basamağı sırasında analitin yalnızca ufak bir kesri elektrot yüzeyine birikir. Bu yüzden kantitatif sonuçlar, elektrot potansiyelinin kontrol edilmesinin yanı sıra, elektrot boyutu, biriktirme süresi, hem numunenin hem de kalibrasyonda kullanılan standart çözeltilerin karıştırma hızı gibi faktörlere de bağlıdır. Belli bir süre sonra elektroliz ve karıştırma olayı durdurulur ve birikmiş madde analizi için uygun olan voltametrik yöntemle tayin edilir. Analizin bu ikinci basamağında, analiz edilecek madde elektrot yüzeyinde çözülür ve sıyırılır, bu yüzden bunlara sıyırma yöntemleri denir.

Anodik sıyırma yöntemlerinde, elektrot biriktirme basamağı sırasında bir katot olarak, analiz edilecek maddenin ilk haline yükseltildiği sıyırma basamağında ise anot olarak davranır.

Katodik sıyırma yönteminde elektrot, biriktirme basamağında bir anot, sıyırma sırasında da bir katot olarak davranır. Biriktirme basamağında, analiz edilecek madde elektrokimyasal olarak bir ön deriştirme basamağına uğrar; yani elektrot yüzeyindeki analiz edilecek madde konsantrasyonu yığın çözeltideki konsantrasyondan çok daha büyüktür.

Adsorbif sıyırma yöntemleri anodik ve katodik sıyırma yöntemlerine oldukça benzerdir. Burada yaygın bir mikro-elektrot olarak kullanılan asılı civa damla elektrodu, analitin karıştırılan bir çözeltisine birkaç dakika süre ile daldırılır. Sonra elektrodun yüzeyinde analitin birikmesi elektrolitik olarak değil, fiziksel adsorbsiyonla meydana gelir. Yeterince analit biriktirildikten sonra, karıştırma kesilir ve birikmiş madde doğrusal taramalı veya pulslu voltametrik ölçümlerle tayin edilir. Kantitatif analiz numunelerle aynı şekilde işlemlere tabi tutulan standart çözeltilerle yapılan kalibrasyona dayanır.

Dönüşümlü voltametri miktar tayinine yönelik bir yöntem değildir ama analiz edilecek maddenin hangi potansiyelde nasıl davrandığı hakkında bilgi verir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda o maddenin hangi potansiyelde optimum cevabı verebileceğini gösterir.

Sıyırma yöntemleri ise, eser element tayininde önemli yer tutar, çünkü elektrolizdeki ön deriştirme basamağı sayesinde, eser miktardaki analiz edilecek madde başarılı bir şekilde tayin edilebilir. Böylelikle bu basit ve hızlı yöntemlerle  $10^{-6}$ - $10^{-9}$  M aralığında çözeltilerin analizi yapılabilir.

#### **2.1.5.4. Artık akımlar**

Artık akım elektriksel çift tabakanın yükleme akımı ile çözeltideki bazı elektroaktif safsızlıkların indirgenmesi ve yükseltgenmesi sonucu oluşur. Elektroaktif bir madde içermeyen ve sadece iletkenliği sağlamak üzere eklenmiş bir destek elektrolit içeren çözeltiye gerilim uygulandığında çok az da olsa bir akım gözlenir ve bu akım artık akım adını alır. Artık akımın iki nedeni vardır. Birincisi çözeltide bulunabilecek eser miktardaki safsızlıkların indirgenmesidir. Bu safsızlıklara örnek olarak az miktarda çözülmüş oksijen, damıtık sudan gelen ağır metal iyonları, destek elektrolitte kullanılan tuzlardaki safsızlıklar sayılabilir. Artık akımların ikinci nedeni ise, elektronların düzensiz akışından kaynaklanan akımdır. Sonuç olarak bu yöntemlerin doğruluğu ve duyarlılığı *faradayik olmayan* akımın büyüklüğüne bağlıdır.

#### **2.1.6. Elektrokimyasal cevap üzerine etki eden bazı faktörler**

##### **2.1.6. 1. Tarama hızı**

Tarama hızı, elektrokimyasal reaksiyon sırasında elektrot yüzeyinde oluşan difüzyon tabakası ve uygulanan potansiyelle ilgili bir terimdir. Uygulanan potansiyele bağlı olarak difüzyon tabakasında meydana gelen incelme veya kalınlaşma sonucu, analit hakkında bilgi veren akım değerlerinde bir değişim gözlenir. Düşük potansiyellerde difüzyon tabakası kalınlaşır ve bu durum elektronların elektrot yüzeyine ulaşma hızını düşüreceğinden, analite ait pik akım değerleri de düşük olacaktır. Daha yüksek potansiyellerde ise ince olan difüzyon tabakasından hızlıca geçerek elektrot yüzeyine ulaşan elektronlar sayesinde, hedef maddeye ait pik akım değerleri bir noktaya kadar

yükselecektir(<http://www.cheng.cam.ac.uk/research/groups/electrochem/JAVA/electrochemistry/ELEC/14html/cv.html>, 2010).

### **2.1.6.2. Destek elektrolit çözeltileri**

Elektrokimyasal bir reaksiyonun yürütülebilmesi için çözelti ortamının yeteri kadar iletken olması gerekir. Sulu çözeltilerde iletkenlik asitler, bazlar veya tuzlar gibi birçok iyonik maddenin suda çözünmesiyle sağlanabilir. Fakat bu maddelerin çoğu organik çözücülerde çözünmezler veya reaktiflikleri nedeniyle organik substratın elektrokimyasal reaksiyonunu engeller veya yönünü değiştirirler.

Destek elektroliti olarak adlandırılan bu tuzların elektrokimyasal olarak dayanıklı, reaktif olmayan ve kolaylıkla temin edilebilen ucuz maddeler olmaları istenir. Bu amaçlara uygun değişik anyon ve katyonların kombinasyonundan oluşan tuzlar destek elektroliti olarak kullanılırlar. En önemli şart ilgili maddenin çözücü içinde mutlaka çözünmesi gerektiğidir (en az 0.1 M olacak şekilde). Ayrıca destek elektrolit çözeltileri aranan katodik veya anodik limit sınırlarına uymalı ve hedef maddeden önce indirgenip yükseltgenmemelidir. Destek elektrolit çözeltilerinde aranan bir diğer özellik ise kolay saflaştırılabilir olmasıdır.

Destek elektrolit maddesinin yapıldığı çözücünün de büyük önemi vardır. Çözücülerin dielektrik sabitlerinin büyük olması istenir. Dielektrik sabiti çözücü polaritesini yaklaşık olarak veren bir niceliktir, bir başka deyişle dielektrik sabiti, çözücünün zıt yükleri birbirinden ayırma yeteneğinin bir ölçüsüdür. Dielektrik sabitinin yüksek olması polarlığın da yüksek olduğuna işaret eder. Suyun dielektrik sabiti yaklaşık 80' dir ve en iyi polar çözücü sudur. Çözücünün polar olması iyonik bileşikleri kolayca çözmesini sağlar, iletkenliğini artırır ve direncin yüksek olmasını sağlar.

### **2.1.6.3. Çözelti pH' sı**

Şartlandırma çözeltisinin pH' sı solüsyondaki metal iyonlarının çözünürlüğünü ve hücre duvarındaki fonksiyonel grupların iyonizasyon durumunu etkilediği için önem taşır (Alpat

et al. 2008). Hidrojen iyonlarını tüketen veya üreten bir elektrot olayında, çözelti iyi bir şekilde tamponlanmadıkça elektrot yüzeyindeki çözeltinin pH' sını önemli ölçüde değiştirebileceği vurgulanmalıdır. Bu değişimler reaksiyonun indirgenme potansiyeline etki eder ve yayvan, zayıf olarak tanımlanmış dalgalara neden olur (Nielsen and Utley 2001).

#### **2.1.6.4. Destek elektrolit çözeltisinin konsantrasyonu veya iyonik gücü**

Voltametri çalışmalarında ortamın iletkenliği ve elektroaktif maddenin elektrot yüzeyine sadece difüzyonla aktarımı destek elektrolit çözeltisi ile sağlanır. Destek elektrolit bu göreve ek olarak bazı uygulamalarda ortamın pH' sını ayarlayabilen bir tampon veya ortamda bazı iyonları kompleksleştiren bir ligand olarak görev yapar.

Kullanılan çözeltinin iyonik gücü, çözeltinin iletkenliği, direnci ve dolayısıyla analit maddelerin adsorpsiyonu üzerinde etkiye sahiptir. Yüksek konsantrasyondaki çözeltilerdeki destek elektrolit madde miktarının fazla olması sebebi ile çözünen iyonlar ve analit madde arasında doğabilecek bir yüzeye tutunma yarışından dolayı elektrokimyasal cevap üzerinde negatif bir etkiye neden olabilir. Diğer şekilde ise iyi tamponlanmış düşük iyonik güce sahip bir çözelti herhangi bir yarışmaya neden olmayacağı gibi, elektrokimyasal hücredeki direnci sabitler ve elektron göçünün olmasını engelleyerek statik bir çalışma ortamı oluşturur.

#### **2.1.6.5. Şartlandırma süresi**

Şartlandırma zamanı yüzeye adsorblanan madde miktarı ile doğrudan ilgilidir ve yöntemin duyarlılığını etkilemesi açısından önem taşır. Optimize edilmiş şartlandırma zamanı tayin limitlerinin düşmesini sağlar. Elektrot yüzeyi doyum noktasına ulaşıncaya dek şartlandırma zamanı ile analit konsantrasyonu arasında doğru bir orantıdan söz edilebilir, ancak çok uzun şartlandırma sürelerinde elektrot yüzeyindeki analit bağlayıcı bölgelerin doyumluğundan dolayı, bir süre sonra elektrokimyasal cevaplarda sapma görülebilir. Bu nedenlerle, ilgili çalışmalarda şartlandırma süresinin optimize edilmesi gerekir.

### **2.1.6.6. Deposizyon potansiyeli ve deposizyon süresi**

Elektrot yüzeyine tutunan metallerin indirgenmesi veya çökmesi için uygulanan potansiyele deposizyon veya çöktürme potansiyeli; metallerin metalik formlarına indirgenmeleri sırasında harcanan süreye ise deposizyon süresi denir (Mojica et al. 2007).

## **2.2. Biyosensörler**

### **2.2.1. Tanımı ve tarihçesi**

Biyosensörler, biyolojik veya biyolojik olarak türetilmiş sensör elementinin, bir fizikokimyasal çevirici veya transducer ile bütünleştirilmesiyle oluşan kompakt analitik araçlardır (Turner et al. 1987). Biyosensörler biyolojik algılayıcı elementin seçiciliği ve hedef analitin konsantrasyonuyla orantılı olarak sinyal üretirler. Bu sinyal proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak veya oksijen gibi gazların salınması ya da yükseltgenmesinden, ışık emisyonundan, absorpsiyon ya da reflektansdan, ısı emisyonundan, kütle değişimi ve bunun gibi değişimlerden kaynaklanır (Lei et al. 2006). Sinyal transducer yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışığın absorpsiyonu ya da elektrokimyasal, termal, optik olarak ya da piezo elektrik anlamda kütle artışıyla ölçülebilir forma dönüştürülür. Sinyal ayrıca ileriki analizler için güçlendirilebilir, işlenebilir veya depolanabilir. Prensipite herhangi bir reseptör herhangi bir transducerle birleştirilip işleyen bir biyosensör üretilebilir (Junhui et al. 1997).

Biyosensörlerin tarihi 50'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O<sub>2</sub> miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons Glikoz oksidaz (GOD) enzimini O<sub>2</sub> elektrodu ile kombine ederek kanın glikoz düzeyini ölçmeyi başardılar. Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.

Bir biyolojik sıvıdaki glikoz ve çözülmüş oksijen elektrot etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glikoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O<sub>2</sub> harcanır. Ortamdaki glikoz bittiğinde O<sub>2</sub> tüketimi durur. O<sub>2</sub> elektrotu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözülmüş O<sub>2</sub> ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glikozun oksidasyonu için harcanan O<sub>2</sub> olup buradan biyolojik sıvıdaki glikoz miktarı hesaplanır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine biyosensörler adı verilir.

## **2.2.2. Biyosensörün temel bileşenleri**

### **2.2.2.1. Biyolojik kısım veya tanıyıcı kısım**

Biyosensörde en önemli bileşen tayin edilecek maddeye karşı son derece hassas fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren biyolojik ajan veya biyoreseptördür. Bu reseptörler tek bir substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır. Temel olarak üç grup biyoreseptör vardır, bunlar; biyokatalitik reseptörler, biyoafinite reseptörleri ve hibrit reseptörlerdir (Mehrvar et al. 2000).

Biyokatalitik reseptörler analiti belirlenmeyen formdan belirlenebilir forma dönüştürerek transduserle kaydedilebilir forma sokarlar. Biyokatalitik ajanlar analiz edilecek madde üzerinde moleküler değişime neden olmaktadır ve bu dönüşüm sonucu ortamda artan veya azalan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir. Biyokatalitik tanıma elementleri enzim içeren sistemler, hücreler (mikroorganizmalar; örneğin bakteriler, ökaryotik hücreler, mayalar), hücre organelleri ve bitki, hayvan doku parçalarından oluşurlar (Mello and Kubota 2002).

Afinite bazlı biyosensörler belirli bir ligandı termodinamik olarak sabit kompleks formuna dönüştüren seçici etkileşimler oluştururlar (Mello and Kubota, 2002). Antibadiler, nükleik asitler, lektinler, boyalar, hücre membran reseptörleri ve diğer spesifik bağlayıcı ajanlar gibi biyolojik komponentler biyoafinite reseptörlerine örnektir. Hormonlar, ilaçlar, virüsler

tümör antijenleri, bakteri antijenleri ve diğer birçok protein benzeri maddelerin belirlenmesi ve ölçümü immünolojik teknikler vasıtasıyla düşük konsantrasyonlarda bile başarılabilmektedir (Mehrvar et al. 2000).

Hibrit reseptörlerde biyosensör uygulamalarında nükleik asit kullanımı rapor edilmiştir. Bazı parça karakteristiklerinden dolayı nükleik asitler seçici bir şekilde işlemektedirler. Bu sensörlerin kullanım alanları, DNA' da meydana gelen hasarları kimyasal olarak belirleme ve DNA'nın türe özgü diziliminin hibridizasyonu ile mikroorganizmaların belirlenmesidir (Mehrvar et al. 2000).

#### **2.2.2.2. Çevirici kısım**

Biyosensörlerde biyolojik veya biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir sinyallere dönüştürebilen sistemlere transduser denir (Gürsoy et al. 2002). Bir substrat için komponentin aktivitesi  $O_2$  tüketimiyle,  $H_2O_2$  oluşumuyla, NADH konsantrasyonundaki değişimle, floresans, absorpsiyon, pH değişimleriyle, kondüktivite, sıcaklık ya da kütledeki değişimle ölçülebilmektedir (Luong et al. 1997). Transduserler temelde dört grup altında toplanırlar;

- Elektrokimyasal transduserler:
  - Amperometrik
  - Potansiyometrik
  - Kondüktometrik
- Optik transduserler
- Akustik transduserler
- Termal transduserler



### **2.2.3. Biyosensörlerin genel uygulama alanları**

Biyosensörlerin, klinik teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, kalite kontrol, tarım ve veterinerlik, bakteriyel ve viral teşhis, ilaç üretimi endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanımı söz konusudur (Telefoncu 1999).

Biyosensör endüstrisinin pazar olarak medikal, çevre, gıda ve askeri alanları içeren dört temel bölüme sahip olduğu belirtilmektedir. Biyosensör piyasası günden güne gelişim göstermektedir. 2000 yılında 1.4 milyar dolarlık bir piyasaya ulaşacağı, bunun % 45' i tıp , % 22 'si gıda , % 17 'si çevre koruma ve biyoteknoloji, kalan % 16 'sının ise diğer sektörlere yönelik olacağı belirtilmiştir ( Telefoncu 1999, Alcijila ve Radke 2003).

### **2.2.4. Biyosensör tipleri**

#### **2.2.4.1. Elektrokimyasal biyosensörler**

Modern elektro analitik sistemler oldukça düşük tespit limitlerine sahip olup ( $10^{-9}$  M) küçük hacimde örneklerin kullanılmasına (1-2  $\mu$ l) olanak tanımaktadır. Bununla birlikte elektrot sistemi ölçüm ortamından sürekli alınan sinyalin (on-line) takibine izin verir. Elektrokimyasal analiz için gereken malzeme, diğer analitik metotlarla karşılaştırıldığında çok daha ucuz ve basittir. Ayrıca elektrokimyasal sensörler optik esaslı sensörlere göre bulanık ortamda çalışabilme, karşılaştırılabilir enstrümental duyarlılık, minyatürleşmeye uygunluk gibi avantajlara sahiptir. Bu başlık altında en yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili biyosensörlere rastlanmaktadır.

*Potansiyometrik biyosensörler:* Potansiyometri, bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas almaktadır ve belirlenen elektrot potansiyeli doğrudan analit derişimini tanımlamaktadır. Potansiyometrik sensörlerin düşük hassasiyet, spesifik olmayan etkileşimlere ait ve aletsel sinyal alınması gibi büyük problemleri vardır. Özellikle sinyal/gürültü oranı analitik problemlere sebep olabilmektedir.

*Voltametrik biyosensörler:* Mikrobiyolojik reaksiyonlar, genellikle iletkenlik ve kapasitansta artma, empedansta azalmaya sebep olmaktadır. Buna dayanarak rezistans, kapasitans, iletkenlik ya da empedanstaki değişimin ölçümünü esas alan sensörler bu grupta yer almaktadır. Klinik örneklerdeki bakteri tespitinde, spesifik patojen tespitinde, endüstriyel mikrobiyal proses kontrolünde bu sensörlerden faydalanılmaktadır.

*Amperometrik biyosensörler:* Genel anlamda amperometri, bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır. Amperometrik biyosensörlerde akım şiddeti, çalışma elektrotunda yükseltgenen veya indirgenen elektro aktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur. Referans elektrot olarak görev yapan ikinci bir elektrot vasıtasıyla, akım şiddetinden analiz edilecek türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanır.

Elektrokimyasal reaksiyonlarda çoğu analitlerin redoks eşi olarak hareket edememesinden dolayı doğrudan olarak analiz edilebilecek az miktarda uygulama vardır. Bu yüzden algılayıcı elektrot üzerinde analitin elektrokimyasal reaksiyonu için elektrokimyasal aktif etiketler (doğrudan veya enzimatik reaksiyon sonucu ürün olarak) gereklidir. Oksijen ve Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ) elektrotları en popüler olanlarıdır.

#### **2.2.4.2. Optik biyosensörler**

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilerek hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal yada fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar.

Optik çeviricilerin kullanıldığı durumda iki genel sınıf vardır. Birincisinde, ışığın iletimindeki değişimin ölçülmesi, ikincisinde ise floresansın ölçülmesi söz konusudur. Işığın iletimindeki değişimin ölçülmesine dayalı optik esaslı sensörlerde, ölçüm sistemi madde derişimine bağlı olarak absorbands veya lüminesansta değişim gösteren bir boya içerir veya  $CO_2$ ,  $O_2$  veya pH değişimi gibi bir fizikokimyasal özellikten faydalanılır. Bu sensörlerde en önemli etken fiber boyunca ışık iletiminin etkinliğidir. İkinci sınıf, fiberin kendi özelliklerindeki (intrensek) değişimleri kapsar ve arka alan (evanescent) biyosensörler ve yüzey plazmon rezonans biyosensörler olarak iki gruba ayrılır.

### 2.2.4.3. Termal biyosensörler

Temel prensipleri; bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat derişiminin belirlenmesine dayanır. Bütün biyolojik reaksiyonlar ekzotermiktir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır. Sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamdaki termistörler veya termofiller aracılığıyla izlenir. Kullanılan termistörler çok küçük sıcaklık değişimlerine bile duyarlıdır. Dolayısıyla çok düşük miktardaki substrat derişiminin ölçümüne ( $10^{-5}$  M) olanak tanırılır.

### 2.2.4.4. Kütle hassas biyosensörler

Çevirici olarak piezoelektrik kristallerin kullanıldığı kütle hassas biyosensörler, rezonans frekandaki değişime dayanarak santimetrekarede nanogram seviyesinde kütle değişimini ölçebilen ve bu yüzden de antikör-antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılan biyosensörlerdir. Kütle hassas biyosensörlerin çalışma prensibi piezoelektrik etkiye dayanır. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklılaşmanın ölçülmesiyle sonuca ulaşılır.

Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklılaşmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır

### 2.2.5. İdeal biyosensörlerin temel özellikleri

#### ➤ Seçicilik

İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli derecede seçicilik mevcut değilse bu eksikliği gidermek üzere ek işlemler yapılır.

➤ *Kullanım ömrü*

Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametrelerini de etkilemektedir.

➤ *Kalibrasyon gereksinimi*

İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi beklenir. Fakat bu özellik teoride planlandığı gibi, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler sıklıkla kalibre edilmelidirler.

➤ *Tekrarlanabilirlik*

İdeal bir biyosensör için elektrotun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçları okuması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa uygulamalarında o denli iyi olacağından söz edilebilir.

➤ *Kararlılık*

Elektrot stabilitesinin yani kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca pH, ısı, nem, ortam, O<sub>2</sub> derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

➤ *Yüksek duyarlılık*

Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin en önemli özelliklerinden biridir.

➤ *Yeterli düzeyde tayin sınırı*

Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişimin altında olması gerekir. Belirtilen bu sınır elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

➤ *Geniş ölçüm aralığı*

Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge, biyosensörlerden alınan akım-derişim eğrilerinin doğrusal olduğu derişim aralığıdır.

➤ *Hızlı cevap zamanı*

Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

➤ *Hızlı geriye dönme zamanı*

Geriye dönme zamanı, örneğin amperometrik çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

➤ *Basitlik ve ucuzluk*

Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür.

➤ *Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik*

Elektrotların sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir (Hall 1990, Buerk 1993).

#### **2.2.6. Biyosensörlerin avantajları ve dezavantajları**

Genel olarak tüm analitlerin ölçüm tekniklerinde; kimyasalı bulunduğu kompleks yapıdan ekstrakte etmek ve girişim yapabilecek maddelerin uzaklaştırılması için saflaştırmak ve daha sonrasında tayin aşaması söz konusudur. Günümüzde ince tabaka kromatografisi (TLC), sıvı kromatografisi (LC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) en çok kullanılan analit ayırma yöntemleri arasındadır (Garden ve Strachan, 2001). Kromatografik yöntemlerle ayırma işlemi gerçekleştirildikten sonra UV absorpsiyonu, floresans ölçümü, kütle spektrofotometrisi ya da amperometrik tayin yöntemleri kullanılarak analiz yapılmaktadır. Saflaştırmak için kromatografik yöntemler yanında “analit-spesifik antibadi” etkileşimlerinin kullanıldığı immuno kimyasal teknikler de uygulanmaktadır.

Biyosensörler diğer analiz yöntemleri ile yarış içindedir. Biyosensörler diğer geleneksel tekniklere göre daha fazla avantaj sağlarlar (Petanen ve Romantschuk 2003). Bu yarışta, uygun hassasiyeti ve doğrusallığı göstermesi gerekirken, başlangıçta bazı avantajları da taşımaktadır. Biyosensörlerin yüksek spesifiklik yanında; renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır (Telefoncu 1999). Biyolojik algılayıcı elementlerinin seçiciliği örnek ön hazırlığına ve fazla miktarda örneğe bağlı kalmaksızın kompleks karışımlarda gerçek zamanlı analiz için çok yüksek spesifiklikte cihazların geliştirilmesine elverişlidir. Biyosensörler ayrıca düşük maliyete, hıza, basit kullanıma sahip ve çoğaltılabilir analitik cihazlardır (Flynn et al. 2002, Turpeinen et al. 2003, Velasco-Garcia ve Mottram 2003). Biyosensörler dondurularak kurutulabilirler, böylece onları kullanmak ve stoklamak daha da kolaylaşır. Dondurularak kurutulmuş hücreler arazi çalışması için uygundur çünkü günlük olarak kültüre alınmalarına ve spesifik bir şekilde stoklanmalarına gerek yoktur. Ancak duyarlılıkları düşebilir. Bu durumda hücreler suda inkübe edildikten sonra tekrar besi ortamına alınırlarsa duyarlılıklarını yeniden kazanırlar (Tauriainen et al. 1997).

Biyosensörlerin kompleks maddelerin rasyonel ve ucuz olarak tayininde kullanımı ekonomik ve toplumsal ağırlık kazanmalarını sağlamıştır. Biyoçip teknolojisindeki gelişmelere bağlı olarak biyosensörlerin önemi ve ağırlığı gittikçe artacaktır. Bunun yanında biyosensör hazırlamanın uzun sürmesi, moleküler biyolojik süreçler hakkında yeterli bilgi birikiminin olmaması gibi sorunlar da biyosensörlerin yaygınlaşmasını yavaşlatmaktadır.

Biyosensörlerin ticari olarak üretilmesine engel teşkil eden bazı etkenler vardır. Bunlar biyoreseptörlerin, antibadilerin ve enzimlerin uzun süreli stabilizasyonundaki sorunlar, sensörlerin sterilize edilebilirlikleri, in vivo uygulamalar için biyouygunluk sorunları, diğer maddelerle oluşan spesifik olmayan adsorbsiyonlar, enzim bazlı sensörlerde immobilizasyon ve mediator sorunları, gıdalardaki diğer bileşenlerin oluşturduğu girişimin azaltılmasındaki problemler, sensörlerin ufaltılmasındaki problemler sayılabilir (Deshpande ve Rocco 1994). Sterilizasyon iki açıdan önemlidir, birincisi korumasız olan sensör bölümüne örnekten bulaşabilecek mikroorganizma ya da enzimlerin yarattığı sorunlar ve ikincisi in-line sistemlerde biyosensör materyalinden oluşabilecek sızıntı ya da bulaşmanın gıdaya ya da fermentasyona etki etmesidir (Prodromidis ve Karayannis 2002).

Uzun dönem içinde gelişen sensör teknolojisi aşağıda belirtilen üstünlüklere sahip birçok yeni uygulamaya olanak sağlayacaktır (Biran et al. 2003):

- Yüksek duyarlık,
- Kısa ölçüm süresi,
- Gereksinime göre işlem akışı,
- Ölçüm ve analiz giderlerinde düşme,
- Otomatik ölçüm ve ayar sistemlerinin devreye sokulması,
- Multi sensör sistemlerinin geliştirilmesi, aynı anda birçok analitin tayini.

Bütün bunlara rağmen biyosensör alanında çözülmesi gereken birçok problem de vardır:

- Biyokomponentlerin ömrünün kısa olması,

- Biyosensör hazırlamanın uzun sürmesi,
- Moleküler biyolojik süreçler hakkında yeterli bilgi birikimi olmaması,
- Biyokompatibilite sorunları,
- İmplant edilebilen sensörlerin steril tutulabilme güçlüğü,
- Mikroorganizmaların genetik stabilitelerinin düşük olması,
- Gerekli duyarlılığa ve seçiciliğe sahip olmayan mikroorganizmalar.

Yukarıda belirtilen sorunların çözümlenmesi geleneksel analiz teknikleri ile yarışabilen ve rutin analizlerde kullanılabilen biyosensör aletlerin piyasaya sunulmasına olanak sağlar. Başarıyı garantilemek için bilim adamları ve mühendislerin biyokimya, moleküler biyoloji, kimya, fizik, malzeme bilimi, yarı iletken elektroniği ve teknolojisi ile bilgisayar teknolojisi alanlarında sıkı işbirliği yapmalarında zorunluluk vardır.

### **2.2.7. Mikrobiyal biyosensörler**

Geniş çapta kimyasal maddeleri tespit edebilmeleri, genetik olarak değiştirilmeye yatkın olmaları, değişik sıcaklık ve pH aralıklarında çalışmaya elverişli olmaları mikrobiyal sensörlerin en önemli avantajları arasındadır (Mulchandani ve Rogers 1998). Mikroorganizmalar değişik reseptör davranışları gösterirler ve Biyolojik Oksijen İhtiyacı (BOD), toksisite ve mutajenite testlerinde başarı ile kullanılırlar.

Mikrobiyal biyosensörlerde, hücreler ve transduser (çevirici) arasında sıkı bir etkileşim olması gerekir. Bu nedenle mikrobiyal bir sensörün üretimi sırasında mikroorganizmalar çevirici tabaka üzerinde çok yakın bir şekilde tutuklanırlar. Burada kullanılan tutuklama yöntemi sonuç üzerinde kritik etkiye sahiptir. Mikroorganizmalar transduser veya destek matrisi üzerine fiziksel veya kimyasal yollarla tutuklanabilirler. Kimyasal olarak kovalent bağlama veya çapraz bağlama, fiziksel olarak adsorbsiyon en yaygın kullanılan metodlardır (Kizek et al. 2003, Sures 2004). Doku kültürleri, organeller ve mikroorganizmaların immobilizasyonunda daha çok polimer jellerde tutuklama yöntemi



kullanılır. Polimer matriksi biyokatalizatörün kaçışını engellerken küçük substratlar ve ürün moleküllerinin geçişine engel olmaz (Telefoncu 1999).

Bir mikrobiyal biyosensör, mikroorganizmalardan ve oldukça seçici bir transduserden meydana gelir. Mikrobiyal sensörler tıp, gıda güvenliği, biyogüvenlik, çevresel denetlemeler gibi değişik alanlarda hedef analitin tayini için kullanılabilirler. İlk olarak tasarlanan mikrobiyal sensörlerde mikroorganizmaların metabolik fonksiyonlarından ve solunumla ilgili enzimlerinden faydalanılarak, bu sistemlerin substratları veya inhibitörleri tayin edilmekteydi. Günümüzde ise genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalarla toksisitenin ve kirletici maddelerin biyolojik olarak tespitini sağlamaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Lei et al. 2006).

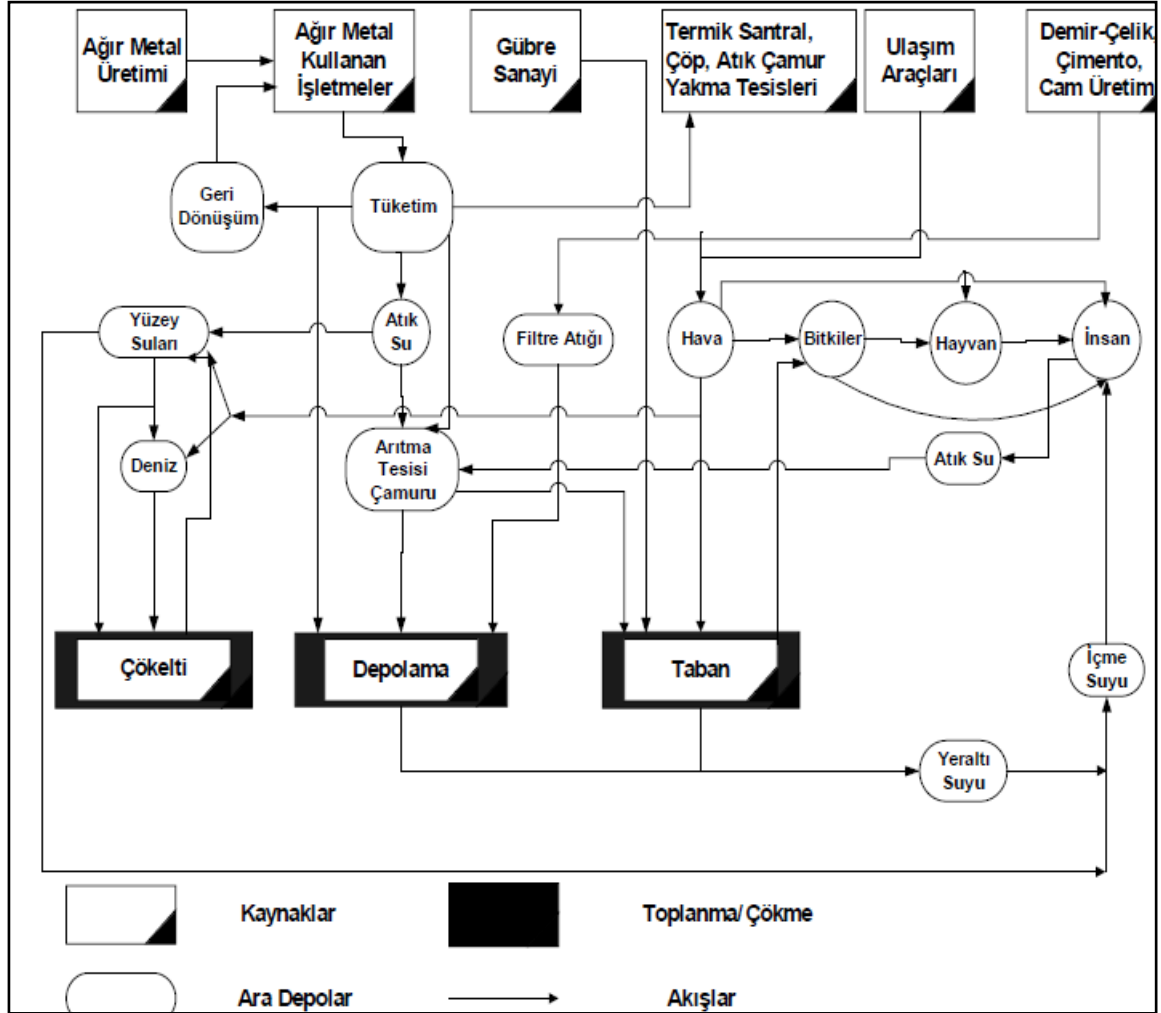
## **2.3. Ağır Metaller**

### **2.3.1. Ağır metaller ve çevre kirliliği**

Yoğunlukları  $5 \text{ g/cm}^3$  den yüksek olan metallerdir. Çeşitli endüstrilerden, belediyelerden gelen atık suların içindeki metaller su ve toprak kirliliğinin ana nedenleridir. Zehirleyici özelliklerine rağmen ağır metaller taşıdıkları teknolojik önem nedeni ile endüstride geniş ölçüde kullanılırlar. Metal kirliliği içeren atık sular; başlıca maden işletmeleri (kurşun, çinko, demir, bakır, gümüş, krom, altın ve uranyum eldesine yönelik süreçler sonucunda), metal endüstrileri (demir- çelik, bakır, çinko, krom vb.) ve diğer metal kaplama, kurşun batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, elektrik- elektronik, kimya, boya ve otomotiv endüstrilerinden çıkmaktadır (Şengül 1991). Süreçleri gereği bu metalleri kullanan endüstrilerin atıklarında civa, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi metal iyonları bulunmaktadır.

Havaya atılan ağır metaller, sonuçta karaya ve buradan bitkiler ve besin zinciri yoluyla da hayvanlara ve insanlara ulaşırlar ve aynı zamanda hayvan ve insanlar tarafından havadan aerosol olarak veya toz halinde solunurlar. Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla

da hayvan ve insanlar üzerinde etkin olurlar. Ağır metallerin doğaya yayınımları dikkate alındığında çok çeşitli sektörlerden farklı işlem kademelerinden biyosfere ağır metal atılımı gerçekleştiği bilinmektedir. Şekil 2.3' de farklı sektörlerden biyosfere ağır metal yayınımları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayınımları (Kahvecioğlu et al. 2004)

### 2.3.2. Ağır metallerin canlılar üzerindeki etkileri

Metaller içerisinde, kurşun, çinko, bakır, kobalt, kadmiyum, krom, nikel, arsenik, civa ve gümüş gibi metal iyonları kalıcı etkilerinden dolayı canlı sistemler ve çevre sağlığı yönünden önem taşımakta olup belirli bir sınır aşınca da son derece toksik etkiler göstermektedirler (Gadd ve Griffiths 1978, Ting et al. 1991, Wong ve Kwok 1992).

Tüm canlıların solunum sistemleri ağır metal soluması ile baskılanır. Ağır metaller kanın asitlik oranını arttırmaları, vücut bu düzeyi normalleştirmek için kemiklerden aşırı miktarda kalsiyum iyonu çeker ve bu durum osteoporozu hızlandırır.

Metaller canlıların yaşam süresinde önemli roller üstlenirler. Bazı metaller, örneğin sodyum, potasyum, kalsiyum, demir, krom canlı vücudunda görevler üstlenen ve mikronutrientler olarak adlandırılan gruba girerler. Redoks tepkimelerinde kullanılırlar, elektrostatik interaksiyonlarda molekülleri stabilize ederler, enzimlerin yapısal bileşeni olarak görev alırlar, osmotik basıncın düzenlenmesinde etkilidirler. Örneğin bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon sürecinin vazgeçilmez parçasıdır (Björnsen vd. 1988).

Bazı metallerin ise yararlı hiçbir etkisi yoktur ancak bazı canlı grupları üzerinde tahribatlara, hastalıklara neden olurlar. Bu metaller gerekli olan bazı metallerin bağlanma bölgelerine engel olarak ligand interaksiyonunu inhibe ederler. Ancak her iki gruptaki metaller de yüksek konsantrasyonlarda hücre membranına zarar verirler, enzim spesifitesini değiştirirler, hücre fonksiyonları durdurabilirler ve DNA'nın yapısını bozabilirler. Ağır metalin yarattığı toksisite ağır metalin türünden, konsantrasyonundan, ortam pH'ından ya da metal iyonlarının çözünürlüğünden, kimyasal yapısından, redoks ve kompleks oluşturma kabiliyetinden kaynaklanabilir. Bu nedenle özellikle düzenli olarak tüketildiklerinden dolayı içme sularının ve yiyeceklerin içerebileceği maksimum konsantrasyon değerleri saptanmıştır ve yasal kuruluşlar tarafından düzenli olarak kontrol edilmeleri zorunlu kılınmıştır.

Krom biyolojik sistemlerde bulunan en toksik ve mutajenik metal iyonudur. Krom, metal alaşımlandırmada ve boyalar, çimento, kâğıt, kauçuk ve diğer malzemeler için pigment olarak kullanılmaktadır. Düşük seviyelerde kroma maruz kalındığında, deride iritasyon ve ülser meydana gelir. Uzun süreli maruz kalındığında böbreklerde ve karaciğerde hasara yol açabildiği gibi kan dolaşım sistemini ve sinir dokularını tahrip edebilir. Krom daha çok sulu ortamlarda birikerek çoğalır. Alerjilere, yaralara, solunum yolu hastalıklarına ve egzemaya neden olabilir. Bu toksisitenin nedeni sülfat iyonu kanalları yardımıyla membranı kolayca geçebilen hegzavalent krom iyonlarıdır. Membranı geçen iyonlar

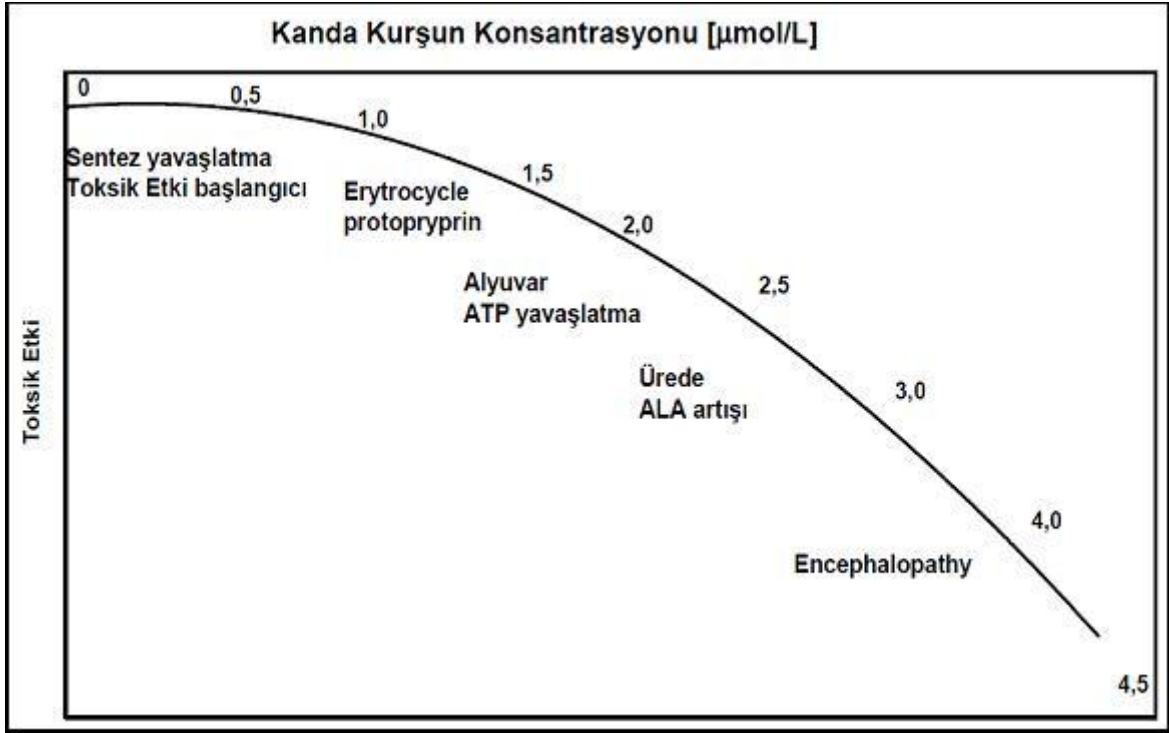
redüksiyon tepkimelerine katılarak çeşitli reaktif ara ürünlerin oluşmasına neden olurlar. Bu ara ürünler de hücre organellerine, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verirler.

Nikel bileşiklerinin solunması sonucunda solunum borusunda tahribat, immunolojik değişim, alveolar hücre sayısında artış gözlenir. Deri teması alerjik deri hastalıklarına yol açar, nikel işinde çalışanlarda astım, burun ve gırtlak kanseri vakalarına rastlanmıştır.

Kadmiyum, endüstriyel olarak nikel/kadmiyum pillerde, korozyona karşı özellikle denizel koşullara dayanımı nedeniyle gemi sanayinde çeliklerin kaplanması, boya sanayinde, PVC stabilizatörü olarak, alaşımlarda ve elektronik sanayinde kullanılır. Kadmiyum empürüte olarak fosfatlı gübrelerde, deterjanlarda ve rafine petrol türevlerinde bulunur ve bunların çok yaygın kullanımı sonucunda da önemli miktarda kadmiyum kirliliğine ortaya çıkar. Kadmiyuma uzun süreli maruziyetten en fazla etkilenen organ böbreklerdir. Yapılan araştırmalar böbrekte biriken kadmiyumun böbrek fonksiyonlarını bozduğunu göstermiştir.

Kurşun, farklı enzim sistemleri ile etkileşim göstermesi nedeni ile birçok organ ve sistem kurşun birikimi için odak noktayı oluşturur. Kurşun, duyu ve motor sinirlerinin iletişim hızında azalmaya ve geri dönüşümü olmayan beyin hasarlarına neden olur. Şekil 2.4' de kanda bulunan kurşun miktarına bağlı olarak ortaya çıkan fonksiyon bozuklukları verilmiştir.

Kurşun insan faaliyetleri ile ekolojik sisteme en önemli zararı veren ilk metal olma özelliği taşımaktadır. Kurşun atmosfere metal veya bileşik olarak yayıldığından ve her durumda toksik özellik taşıdığından (Çalışma ortamında izin verilen sınır 0,1 mg/m<sup>3</sup>) çevresel kirlilik yaratan en önemli ağır metaldir. 1920' lerde kurşun bileşikleri (Kurşuntetraetil Pb(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>) benzine ilave edilmeye başlanmıştır ve bu kullanım alanı kurşunun ekolojik sisteme yayınımda önemli rol oynamıştır (227.250 ton/yıl ABD). Günümüzde kurşunsuz benzin kullanımı ile atmosfere kurşun yayınımları azalmakla beraber, kurşunsuz benzin bileşiminde bulunan birçok birincil metal üretim aşamasından atmosfere kurşun ve bileşiklerinin yayınımları devam ettirmektedir.



**Şekil 2.4** Kanda bulunan kurşun miktarına bağlı olarak ortaya çıkan fonksiyon bozuklukları (Kahvecioğlu et al. 2004)

Kurşun insan faaliyetleri ile ekolojik sisteme en önemli zararı veren ilk metal olma özelliği taşımaktadır. Kurşun atmosfere metal veya bileşik olarak yayıldığından ve her durumda toksik özellik taşıdığından (Çalışma ortamında izin verilen sınır 0,1 mg/m<sup>3</sup>) çevresel kirlilik yaratan en önemli ağır metaldir. 1920' lerde kurşun bileşikleri (Kurşuntetraetil Pb(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>) benzine ilave edilmeye başlanmıştır ve bu kullanım alanı kurşunun ekolojik sisteme yayınımlında önemli rol oynamıştır (227.250 ton/yıl ABD). Günümüzde kurşunsuz benzin kullanımı ile atmosfere kurşun yayınımlı azalmakla beraber, kurşunsuz benzin bileşiminde bulunan birçok birincil metal üretim aşamasından atmosfere kurşun ve bileşiklerinin yayınımlı devam ettirmektedir.

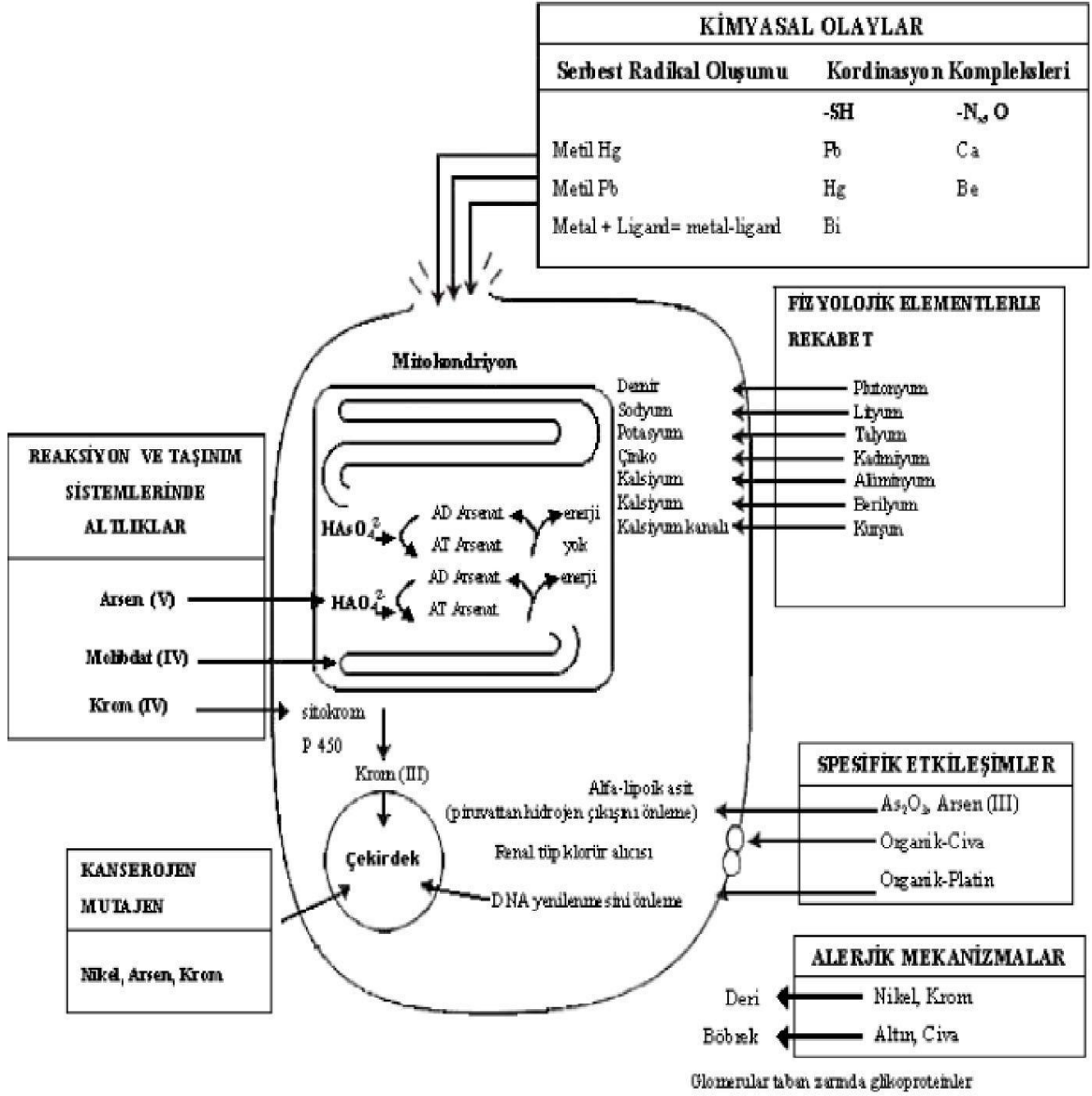
Kurşun 20. yy.' da yüksek oranlarda paslanmaya karşı oksit boya hammaddesi olarak kullanılmıştır. Kurşun oksidin hafif tatlımsı bir tadının olması çocukların bu boya maddelerinin döküntülerini yemelerine ve dolayısıyla özellikle kurşuna karşı hassasiyetleri daha fazla olan küçük çocuklarda ciddi problemlere sebep olmuştur. Almanya ve diğer gelişmiş ülkelerde 1971' de boya maddelerindeki kurşun kullanımı çıkarılmıştır. Kurşunun

diğer önemli kullanım alanları ise; teneke kutu kapakları, kurşun-kalay alaşımli kaplar, seramik sırları, böcek ilaçları, aküler vb. alanlardır.

Kurşunun vücutta absorpsiyonu çocuklarda daha yüksek olmakla beraber normalde % 5 gibi düşük bir oranda gerçekleşmektedir Bu oran dahi kalsiyum ve demir gibi birçok mineralin vücut tarafından emilimini azaltmaktadır. Kana karışan kurşun buradan kemiklere ve diğer dokulara gitmekte ya da dışkı ve böbrekler yoluyla vücuttan atılmaktadır. Kemiklerde biriken kurşun zamana bağlı olarak (yarılanma ömrü yaklaşık 20 yıl) çözünerek böbreklerde tahribata neden olur. Kurşun bir nevi nörotoksindir ve anormal beyin ve sinir sistemi fonksiyonlarına sebep olmaktadır.

Bakır, vücut dokusunun yenilenmesinde ve kemik yapısının sağlamlığının sürdürülmesinde görevli enzimler için gereklidir. Protein sentezlenmesinde ve enerji üretiminde görev alır. Alyuvarların oluşumuna katkıda bulunur. Çinko ve C Vitamini kullanımı ile beyin ve sinir sistemi sağlığı için gereklidir. Saç ve deri sağlığı için faydalıdır. Bakırın aşırı dozda alınması, vücutta bakır fazlalığı oluşmasına neden olur. Bakır fazlalığı ise kanser riskini arttırmasının yanı sıra depresyon, şizofreni, bunaklık, hipertansiyon gibi ciddi zihinsel ve bedensel rahatsızlıklara yol açar.

1932' den itibaren Japonya'da Chissos kimyasalları tarafından civa içeren lağım Minimata sahiline boşaltılmıştır. Deniz ürünlerinde biriken civa 1952 yılında etkisini insanlar üzerinde göstermiştir. 1950' li yıllarda bu yüzden yaklaşık 500 insan hayatını kaybetmiştir. Şekil 2.5' de metallerin insan vücudundaki etki mekanizmaları gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Ağır metallerin insan vücudundaki etki mekanizması (Duffus ve Worth 1996, Rether 2002, Kahvecioğlu et al 2004).

### 2.3.3. Ağır metal tayin yöntemleri

Ağır metallerin tayininde biyosensörler veya kimyasal sensörler haricinde, genellikle spektroskopik, voltametik ya da kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler düşük konsantrasyonlardaki elementleri tayin edebilmelerine rağmen in-sitü analizler için uygun değildir (Malitesta ve Guastico 2005).

#### 2.3.4. Mikroorganizmaların ağır metalleri bağlama özellikleri

Bazı mikroorganizmalar, yüzeylerinde yüksek moleküler ağırlıklı polifosfatlara benzeyen grupları ile metallerle kompleks oluşturarak metali bağlayabilmektedirler (Ting et al. 1991, Scott ve Karonjkar 1992, Holan et al. 1993, Sağlam ve Cihangir 1995). Bu fonksiyonel gruplar amino, karboksilik, sülfidril, fosfat ve thiol grupları olup metalleri bağlamada farklı afinite ve özgülüğe sahiptirler (Naja et al 2005). Diğer yandan hücre duvarında bulunan proteinleri bağlamak için aktif bölgeler oluşturmakta ve bu şekilde hücrelerin metale karşı ilgilerini arttırmaktadırlar (Bruins 2000). Çizelge 2.1 'de metal biyosorbsiyonunda kullanılan bazı mikroorganizmalar sunulmuştur.

*Biyosorbsiyon:* Biyosorpsiyon metabolizma bağımlı bir süreç olduğu için hem ölü hem de canlı hücrelerde gerçekleşebilir. Ancak genelde ölü organizmalarla yapılan adsorbsiyon işlemine biyosorbsiyon denir. Ölü ve canlı hücrelerin metal alabilme kapasiteleri karşılaştırıldığında çoğu durumda organizmanın iyon adsorblama yeteneğinin ölü durumda daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ölü organizmalar sorbent olarak kullanıldığında rejenere edilip yeniden kullanılmalrı da mümkün olmaktadır.

Biyosorbsiyonun bazı avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Biomasın tekrar kullanılabilmesi,
- Toksikiteden etkilenmeksizin ağır metal giderimi,
- Kısa sürede sonuç alma,
- Belki toksik olabilecek ikincil atıkların oluşmaması.

Biyosorbsiyonda metal molekülleri ilk önce hücre duvarının dış tarafındaki polimerlerle kompleks oluştururlar. Ölü hücrelerin biyosorbsiyonu canlı hücrelerden daha yüksektir. Bu durum fiziksel adsorbsiyonla gerçekleşir. Biyosorbsiyon aslında fiziksel ve kimyasal adsorbsiyon, iyon değişimi, kompleksleşme gibi birçok pasif giderim proseslerini adlandırmada kullanılan ortak bir terimdir.



Metal alımında ikinci basamak metabolik aktiviteye dayanır ve aktif giderim adını alır. Bu aşama yavaş cereyan etmekte ve metaller hücre membranının transport özelliğine bağlı olarak sitoplâzmaya geçmektedirler. Genelde hücre duvarlarına metal bağlanması hızlı ve yüksek verimlilikte olurken, hücre sitoplâzmasındaki bölgelerde çok yavaş ve düşük verimlilikte gerçekleşmektedir (Volesky et al. 1993).

*Biyobirikim:* Sadece canlı hücrelerle gerçekleşen adsorbsiyon işlemidir. Biyosorbsiyon yapabilen hücreler ağır metallerin etkilerinden korunmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir, bu mekanizmalar:

- *Metalin hücre içine alınmaması:* Hücre duvarında, zarda veya duvar proteinlerinde meydana gelen değişimler metalin hücreye girişini engeller. *Escherichia coli*'deki "porin" denilen zar proteinlerinin yapısının değişmesi ile birlikte bakırın hücre içine alınmaması buna örnek olarak gösterilebilir. Bu durum sıklıkla tek gen mutasyonu ile açıklanmaktadır. Bu mutasyonla zarın geçirgenliği azalır. Ayrıca metallerin dış zara veya hücre proteinlerine spesifik olmayan şekilde bağlanması da geçirgenliği azaltır. Bakterilerin doğal olarak buldukları ekstraselüler polisakkarit kısım metal iyonlarını biyolojik olarak tutmakta ve onları hücre bileşenleri ile etkileşimden korumaktadır.

- *Metallerin hücreden aktif olarak taşınması:* Metaller aktif taşıma yoluyla hücre dışına pompalanırlar, bu mekanizma plazmit veya kromozom kökenli olabilir. Dışarı pompalama sistemi ATP 'ye bağımlı ve ATP' ye bağımsız olarak gerçekleşir. ATP bağımlı sistemlerde hidrolizle enerji elde edilirken, ATP' ye bağımsız sistemlerde zar potansiyeli metal geçişi için kullanılır. Örneğin Ar *E. coli*'de ATP bağımlı sistemle pompalanırken, *Staphylococcus aureus*'da Ar zar potansiyeli yardımıyla geçer (Nies 2003).

- *Metalin proteinlere bağlanması ile hücre içinde tutulması:* Bu mekanizma ile ağır metallerin hücre içinde bir yerde birikmesi ve hücre organellerle etkileşmesi önlenir.

- *Metallerin hücre dışında tutulması:* *Saccharomyces cerevisia* büyük miktarda glutatyonu boşaltarak nikel adsorbsiyonunu azaltır. Mayanın taşıdığı metilglioksal geni metallerin yoğun olduğu bölgelerde ekstraselüler glutatyon maddesi oluşturur. Toksik

metal bu komplekslere tutunur ve hücreye giremez. Funguslarda bakır direnci sağlanırken, metal oksalat kompleksleri oluşturmak üzere hücre dışına oksalat salgılandığı ispatlanmıştır.

- *Metalin daha az toksik forma dönüştürülmesi:* Bu sistem hücre içinde ve enzimatik yollarla gerçekleşir. Direnç gram negatif ve gram pozitiflerde benzer genler tarafından sağlanır. *Bacillus cereus* RC607 deki direnç ile ilgili olan mer A geninin *Clostridium butiricum*'daki mer A genleri ile nükleotit sekanslarının benzerliği %76.8'den %100'e kadar değişmektedir. Mer A genleri plazmit veya kromozom kökenli olabilirler (Chen-Huang et al. 2003).

Metallerin sorbsiyon verimliliğinde ortamda bulunan metal türüne ve sayısına, bu metallerin kendilerine has özelliklerine bağlı olarak sinerjik ve antagonistik etki görülmektedir (Volesky et al. 1993). Diğer bir deyişle bir metal diğer bir metalin birikimini etkileyebilmektedir.

**Çizelge 2.1** Metal biyosorbisyonunda kullanılan bazı mikroorganizmalar

| <b>Mikroorganizmalar</b>        | <b>Metaller</b>         |
|---------------------------------|-------------------------|
| <b>Bakteri türleri</b>          |                         |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>   |                         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Kadmiyum/ nikel         |
| <i>Citrobacter sp.</i>          | Kadmiyum/ uranyum       |
| <i>Arthroba ter sp.</i>         |                         |
| <b>Maya türleri</b>             |                         |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |                         |
| <i>Saccharomyces cerevisia</i>  | Çinko/ bakır/ uranyum/  |
| <i>Sporobolomyes roseus</i>     | kadmiyum                |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i>   | Bakır/ kobalt/ gümüş    |
| <i>Candida utilis</i>           |                         |
| <b>Fungus türleri</b>           |                         |
| <i>Aspergillus versicolor</i>   |                         |
| <i>Neurospora crassa</i>        |                         |
| <i>Pleurotus ostreatus</i>      | Nikel/ kadmiyum/ bakır/ |
| <i>Rhizopus arrhizus</i>        | uranyum                 |
| <i>Penicillium spinulosum</i>   |                         |
| <i>Aspergillus niger</i>        |                         |
| <b>Alg türleri</b>              |                         |
| <i>Phormidium sp.</i>           |                         |
| <i>Chlorella bomosphaera</i>    |                         |
| <i>Chlorella vulgaris</i>       | Krom/ çinko/ kurşun/    |
| <i>Scenedesmus nodosum</i>      | Kobalt/ kadmiyum/ altın |
| <i>Scenedesmus crinatus</i>     |                         |
| <i>Sargassum natans</i>         |                         |

(Aksu ve Kutsal 1991, Favero et al. 1991, Jang et al. 1991, Chang et al. 1992, Shravan et al. 1992, Volesky et al. 1993, Sağ ve Kutsal 1997, Kirowa- Eisner et al. 1999, Naja et al. 2005, Malik 2004, Lin and Lai 2006, Aksu et al. 2009, Ertuğrul et al. 2009, Perez- Silva et al. 2009, Taştan et al. 2010).

- *Metalin daha az toksik forma dönüştürülmesi:* Bu sistem hücre içinde ve enzimatik yollarla gerçekleşir. Direnç gram negatif ve gram pozitiflerde benzer genler tarafından sağlanır. *Bacillus cereus* RC607 deki direnç ile ilgili olan mer A geninin *Clostridium butiricum*'daki mer A genleri ile nükleotit sekanslarının benzerliği %76.8'den %100'e kadar değişmektedir. Mer A genleri plazmit veya kromozom kökenli olabilirler (Chen-Huang et al. 2003).

Metallerin sorbsiyon verimliliğinde ortamda bulunan metal türüne ve sayısına, bu metallerin kendilerine has özelliklerine bağlı olarak sinerjik ve antagonistik etki görülmektedir (Volesky et al. 1993). Diğer bir deyişle bir metal diğer bir metalin birikimini etkileyebilmektedir.

#### **2.4. Çevresel Sorunları Denetlemek Üzere Geliştirilen Bazı Mikrobiyal Sensörler**

Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri denir (Mikkelsen 1996). DNA tanıma yüzeyleri dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (Wang et al. 1997) veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojen maddeler, ilaçlar) tayininde kullanılabilir (Brett et al. 1998). DNA biyosensörlerinin esası DNA hibridizasyonuna dayanmaktadır (Erdem et al. 1999). İşlemin ilk aşaması belirlenmek istenen hedef diziye karşılık gelen kısa bir baz dizilimine sahip olan sentetik oligomerin elektrot yüzeyine bağlanmasıdır. Sonrasında biyosensörün hedefi içeren bir örnek çözeltilisine daldırılmasıyla elektrot yüzeyinde hibrit oluşumu sağlanır. Hibridizasyon elektrokimyasal veya optik bir transduser sinyali ile gözlemlenir (Özsöz 2005).

Metal iyonları için seçici katalitik özellik gösteren DNA sensörleri geliştirilmiştir (Lu et al. 2003). Ancak DNA sensörlerinde biyolojik komponent bir nükleik asittir, böyle bir komponentin ancak belli bir sıcaklık ve pH aralığında kullanılabilmesi çalışmaları sınırlayan faktörlerin başında gelir. Ayrıca genler tarafından metale gösterilen tepki, metal iyonlarının konsantrasyon ölçümlerinde zorluklara neden olabilir.

DNA biyosensörleri çevre sağlığını tehdit eden çeşitli mikroorganizmaların tayininde kullanılmıştır. Çevre sağlığını tehdit eden sulardaki *Cyanobacteria* sınıfından *Microcystis* cinsi mikroorganizmaların biyosensörlerle tayini gerçekleştirilmiştir. *Microcystin* ile görülen akut zehirlenmelerde, insan ve hayvanlarda ölüm ile sonuçlanan ağır karaciğer hasarı meydana gelmektedir (Carmichael 1998). *Microcystin* tayininde kullanılan yeni elektrokimyasal biyosensör, *Microcystis spp.* mikroorganizmalarının 16S ribozomal DNA' daki (rDNA) baz polimorfizmine dayalı 17 bazlı tek zincirli (ss) oligonükleotit olan probun CPE yüzeyine tutturulması ile hazırlanmıştır. Çalışmada hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan MB' nin (metilen blue) çift sarmal DNA (ds DNA) ve tek sarmal DNA (ss DNA) ile etkileşmesi, elektrokimyasal olarak incelenmiş ve *Microcystin spp.*' ye ilişkin oligonükleotitlerin tayini gerçekleştirilmiştir. Başka bir çalışmada U(VI) ve Cd(II)'nin tespiti için monoklonal antikordardan faydalanılmıştır (Khosraviani et al. 1998, Blake et al. 2004).

Yüksek spesifliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Enzim biyosensörleri enzim aktivitesinin metallere inhibisyonu temeline dayanırlar ve kirleticilerin dolaylı tayinini sağlarlar (Cowell et al. 1995, Rodriguez et al. 2004). Saflaştırılmış enzimler substrat veya inhibitör tespiti için çok yüksek spesifiteye sahip olmalarına rağmen, enzim saflaştırmanın pahalı olması ve uzun sürmesi, kofaktör veya koenzim ihtiyacı, bazen birden fazla enzime ihtiyaç duyulması gibi nedenlerden dolayı önemli dezavantajları da beraberlerinde getirmektedirler. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması veya birden çok maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri ve tercihen mikroorganizmalar bu durumlarda ideal alternatifler olmaktadır (Arikawa et al. 1998).

Birçok çalışma genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmaların, biyosensörlerin tanıyıcı bölgesi olarak kullanılmasının mümkün olduğunu göstermiştir (D'souza 2001). Bakteriler değişik çeviricilerle birleştirilerek hücrel tepkilerinin ölçülmesini sağlayan bir sistemle; toprak, su, sediment gibi değişik çevresel ortamlardaki toksisiteyi göstermek amacıyla biyosensör olarak kullanılabilirler (Biran et al. 2003, Kröger ve Law 2005). Bu tür bakterilere ilgili toksik maddeye duyarlı olarak, ölçülebilir sinyal üreten haberci veya reporter genler (örneğin; lux, gfp ya da lac Z genleri) eklenir (Lei et al. 2006). Bakteriyel biyosensör toksik maddeye maruz bırakıldığında, hücre içerisinde meydana gelen bir seri

biyokimyasal reaksiyon sonucu reporter genler tarafından, fiziksel veya kimyasal değişimin derecesini gösterebilen ve sistem tarafından ölçülebilir bir cevap oluşturulur (Biran et al. 2003, Daunert et al. 2000, Tauriainen et al. 2000, Turpeinen et al. 2003). Arsenik, kadmiyum, civa ve kurşun gibi ağır metaller ve metalloidler için bu şekilde bakteriyel biyosensörler geliştirilmiştir. Bu tür bakterilerde metale direnç gösteren gen bölgeleri, spesifik bir transkripsiyonal düzenleyici mekanizmanın kontrolü altındadır ve bu mekanizma ancak metale maruz kaldığı zaman metal direncine spesifik proteinlerin üretilmesine izin verir (Bontidean et al. 2000).

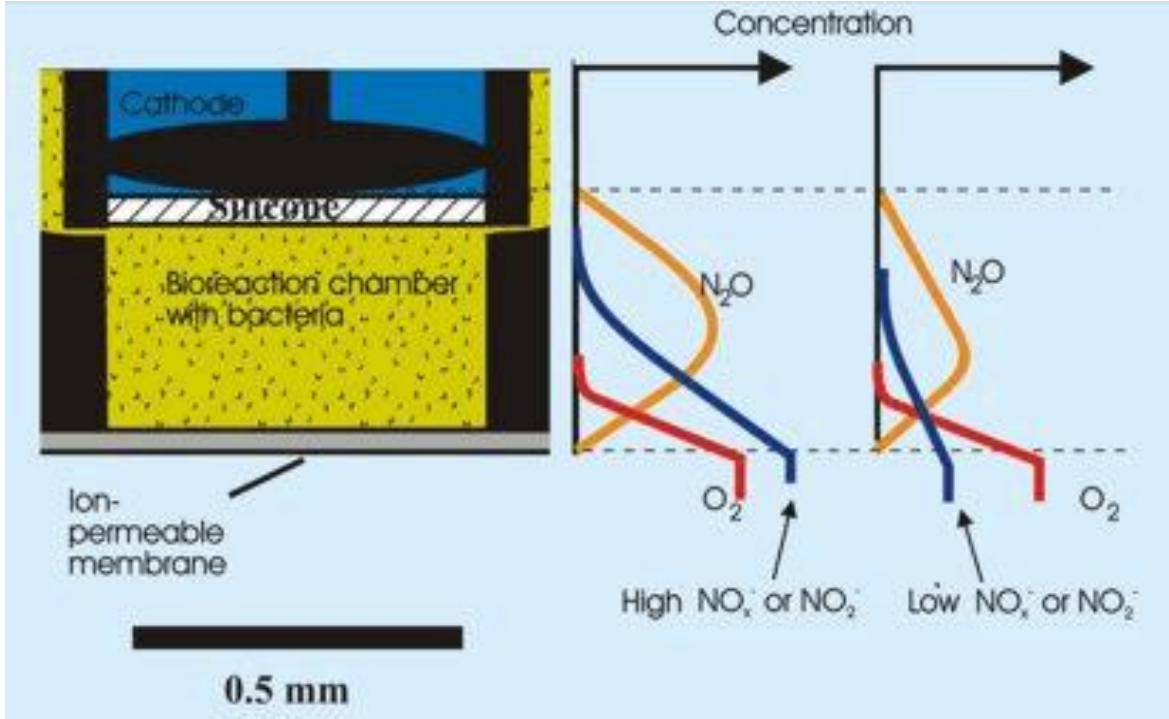
Metale direnç gösteren gen bölgeleri genellikle operonlarda veya plazmitler üzerinde yer alırlar. Direnç genleri kontrollü bir şekilde ve ancak hücreler metale maruz kaldığı zaman ifade edilmeye başlarlar. Bu yüksek hassasiyetlerinden dolayı, ilgili gen bölgelerinden elde edilebilecek füzyon genler toksik metalleri algılayan biyosensörlerin geliştirilmesi amacıyla kullanılabilirler (Ramanathan et al. 1997).

Biyolüminesans canlı mikroorganizmalar yoluyla ışığın Emilimi sonucu ortaya çıkar. Biyosensörlerde eş zamanlı sonuç elde edilmesinde çok önemli bir role sahiptir. Bakteriyel lüminesansdan sorumlu bir gen olan lux geni bu alanda en çok kullanılan genlerden biridir. Lux geni, ilgilenilen analitin konsantrasyonuna bağlı olarak regüle edilen bir promotörle birleştirilir. Bu şekilde istenilen analitin konsantrasyonu, transduser tarafından kaydedilen biyolüminesans miktarına göre belirlenmiş olur (Rensing ve Maier 2003, Belkin 2003). *Vibrio fischeri* metale maruz bırakıldığında, aktive olan lusiferaz enzimi ile lux gen bölgelerinden haberci genlerin ifade edilmesi sonucu, mikroorganizmanın doğal ışığındaki absorpsiyonun ölçülmesi ile ticari olarak toksik metallerin tespiti yapılmaktadır (Corbisier et al. 1993, Ramanathan et al. 1997). Lüminesant bakteri ışığındaki azalmanın tespiti yöntemiyle çalışan Microtox toksisite ölçüm sistemi, ABD’de ve Kanada’da 90’den fazla kamusal içme suyu arıtma tesisinde kullanılmaktadır. Microtox teknolojisi, *Vibrio fischeri* olarak bilinen bakteriyi kullanır. Bunun sebebi, tür olarak bu bakterinin birçok kimyasala karşı hassas olmasıdır. Bu mikroorganizma normal metabolizma sırasında ışık ürettiği için bu işleme çok uygundur. Numunedeki toksik maddeler, organizmaların metabolizmasını ters yönde etkiler ve lüminesans azalmaya neden olur. Bunun anlamı; organizmanın daha az ışık üretmesidir. Normal koşullarda bu organizmalardan yayılan ışık sabittir ve uygun bir lüminometre ile kolaylıkla ölçülebilir.

Sudaki toksisitenin yükselmesi, ışıktan azalmaya yol açar ve bu da Microtox tarafından ölçülerek toksisite analizi yapılır.

Ötrofikasyon olayı deniz sularında nitrojen ve fosfor başta olmak üzere alglerin ve diğer deniz bitkilerinin hızla çoğalmasına neden olan aşırı besin artışıdır. Bu bitkiler öldüğünde ortaya çıkan bakteriler oksijeni azaltarak balık ve diğer deniz canlılarını öldürmektedir. Çok ileri durumlarda balıklar ve diğer canlıların kitlesel ölümleri görülebilmektedir (<http://www.bsm.gov.tr>, 2011). Organik atığın mikrobiyal bozunması; amonyak, nitrat, nitrit, fosfat ve diğer inorganik maddelerin açığa çıkması ötrofikasyon oluşumunun başlıca nedenleridir. Atıkların denizel ortama girişi sadece su kalite parametrelerini değiştirmekle kalmayıp bentik canlıları etkilemekte habitat değişimine neden olmakta ve ötrofikasyon riskini artırarak alanın hassas alan haline gelmesine neden olmaktadır. Denitrifikasyon olayı, elverişli oksijen düzeyinin düşük olduğu ve kolayca ayrışabilen organik madde miktarının fazla olduğu koşullarda ortaya çıkmaktadır (Brohi ve Karaman 1995). Bu tür sorunların biyolojik olarak kısa zamanda ve ucuz maliyetle tespiti için immobilize edilmiş denitrifikasyon bakterilerini içeren bir biyosensör geliştirilmiştir. Kullanılan bakteri nitroz oksit redüktaz enzimini içermemekte ve nitratı direkt olarak nitroz oksite çevirmektedir. Ortamdaki nitroz oksit miktarı sensör tarafından algılanmakta ve elektrokimyasal bir çevirici yardımı ile kaydedilebilmektedir (Kröger ve Law 2005). Yapılan biyosensörün ticari olarak üretimini başlatan Unisense şirketi 2000 yılında Danimarka Patent Ödülünü almıştır.

Toplam nitrit ve nitrat iyonları veya sadece nitrit iyonları, iyon geçirgen zarlı moleküler difüzyon yoluyla geçerek biyolojik tabakaya ulaşırlar. Biyolojik tabakada aktif halde bulunan denitrifikasyon bakterileri sayesinde içeri giren iyonlar nitroz oksite çevrilirler. Denitrifikasyon için gerekli olan elektron vericiler sensör içindeki bir hazneye yerleştirilmişlerdir. Nitroz oksit, sadece gazları geçiren silikon zar vasıtasıyla elektrokimyasal tabakaya geçer ve oluşan sinyaller Picoammeter ile ölçülerek kaydedilir. Biyolojik tabakanın değiştirilebilir olması ve elektrokimyasal çeviricinin yüksek stabilitesi ile uzun ömürlü bir biyosensör oluşur. Bu biyosensörle deniz suyu, tatlı su, çamurlu su, toprak ekstraktları, sıvı gübre gibi birçok çevresel örnekte güvenilir tayinler yapılabilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Unisense nitrat biyosensörü (<http://www.unisense.com>, 2011)

Çevrede ağır metal kaynaklı ortaya çıkan toksisite metallerin biyolojik olarak algılanabilen konsantrasyonlarına bağlıdır. Biyoluminesant mikrobiyal biyosensörler kullanarak, biyolojik olarak algılanabilen metal konsantrasyonlarını belirlemek üzere yoğun şekilde çalışmalar yapılmaktadır. Tibazarwa et al. (2001) *cnrYXH* regülatör genleri ile biyoluminesant özellik gösteren *luxCDABE* haberci genlerini *Ralstonia eutropha* AE2515 suşunda birleştirmiş ve bu suşu Ni(II) ve Co(II) 'nin topraktaki algılanabilir konsantrasyonlarını tespit etmek üzere kullanmıştır. Topraktaki bakırı izlemek üzere genetik olarak değiştirilmiş *Pseudomonas fluorescens* kullanılmıştır (Petersen et al. 2001).

Cr(VI) tespiti için hem bakteriyel temelli hem de enzim inhibisyonuna dayanan biyosensörler geliştirilmiştir. Bakteriyel biyosensörle Cr(VI) tespiti için Ivask et al. (2002) ve Peitzsch et al. (1998) *Alcaligenes eutrophus* olarak da bilinen, rekombinant luminesant *Ralstonia metallidurans* suşunu kullanmışlardır. Bir başka bakteriyel sensör çalışmasında Cr(VI) ve dikromatın dolaylı amperometrik tespiti için *Acidithiobacillus ferrooxidans* kullanılmıştır (Zlatev et al. 2006). İnhibe edilmiş enzim temelli biyosensörler için heksokinaz ve pirüvat kinaz gibi enzimlerle çalışmalar yapılmıştır (Cowell et al. 1995).



Elektrokimyasal yöntemlerle geliştirilen bir biyosensörde ise Cd(II) ve Zn(II) iyonlarının tespiti yapılmıştır. Ancak bu çalışmada daha önce bahsedilenlerden farklı olarak mikroorganizma doğrudan kullanılmamıştır. Ağır metallere bağlanma özelliği olduğu bilinen fitokelatin molekülü ile bir elektrot yüzeyi modifiye edildikten sonra, örnek solüsyonlardaki ağır metallerin fitokelatin yüzeye bağlanması ile oluşan etkileşim elektrokimyasal olarak ölçülmüş ve ilgili biyosensörün ağır metal tayini için hızlı ve ucuz bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Adam et al 2005).

Bunların dışında basınç değişimini izleyen biyosensörlerde geliştirilmiştir. Taşınabilen ve atık sudan doğrudan toksisite analizi yapılmasını sağlayan bir araç olarak geliştirilen bu biyosensör “baroxymeter” olarak isimlendirilmiştir. Biyosensörün çalışma prensibi bakteriyel solunuma bağlı olarak ortaya çıkan basınç değişiminin algılanması şeklindedir (Tzoris 2005).

Atıksu arıtımında kullanılan bitkilerdeki inhibitör etkileri izlemek üzere, mikrobiyal solunum sonucu oluşan CO<sub>2</sub>' in sürekli ölçümüne dayanan bir metot geliştirilmiştir. Biyolojik komponent olarak aktif çamur bakterilerinin kullanıldığı bu yöntemde, solunum aktivitesinin toksik maddelerle düşmesi sonucu, azalan CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, CO<sub>2</sub>' in kızılötesi analizini yapan bir cihazla ölçülmüştür (Aivasidis 2002).

Chouteau et al. (2004) su örneklerindeki ağır metal iyonlarının ve bazı pestisitlerin tayini için bienzimatik konduktometrik biyosensör tasarlamak üzere *Chlorella vulgaris* kültüründen yararlanmışlardır. Algal kültürün ürettiği alkalenfosfataz ve asetilkolin esteraz enzimlerinin farklı toksik bileşikler tarafından inhibe edildiği belirtilmiştir. Çalışmalar bienzimatik biyosensörün Cd(II) ve Zn(II) iyonlarına karşı çok hassas olduğunu gösterirken Pb(II) bienzimatik biyosensörler tarafından algılanamamıştır. Diğer taraftan canlı algal kültür kullanılarak ve optikal floresansın ölçümüne dayanan denemelerinde Pb(II)' nin tutuklanmamış algal kültür tarafından tayin edilebildiği görülmüştür. Pestisitler için yapılan denemelerde parathion ve karbofuranın metilin tersine paraparaoxon metilin *C. vulgaris*' in asetil kolin esteraz aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür. Hem ağır metal iyonlarını hem de pestisitleri içeren ortama maruz bırakılan biyosensörlerden elde edilen sonuçlarda herhangi bir sinerjistik veya antagonistik etki gözlenmemiştir. Sonuç olarak bu

şekilde tasarlanan biyozimatik biyosensörün sulardaki ağır metal iyonlarının ve bazı pesitisitlerin tayininde kullanılabileceği belirtilmiştir. Algal hücrelerin tutuklanması için BSA (Bovin Serum Albümin) ve çapraz bağlayıcı olarak da glutar aldehit kullanılmıştır.

Corbisier et al. (1999) çevredeki ağır metal iyonlarına karşı yüksek spesifiteye sahip biyosensörler geliştirmek amacıyla yaptığı çalışmada, birbirine paralel iki strateji takip etmiştir. İlk stratejisi biyolojik olarak algılanabilen metale maruz kaldığında biyoluminesant veya floresant ışımaya yayan bir "whole-cell" biyosensör tasarlamaktır. Bu tasarım için farklı kaynaklardan elde ettiği, metalle indüklenen promotör bölgeleri ile çalışmış ve oluşturduğu promotör kasetlerinin seçiciliğini tespit etmek üzere luxCDABE haberci genlerini kullanmıştır. Elde ettiği "whole-cell" biyosensörlerin duyarlılığını ve ömrünü farklı tutuklama matrisleri deneyerek araştırmıştır. İkinci stratejide metal bağlayıcı proteinlerle, değişik metallere doğrudan temasını incelemiş ve kapasitans değerlerini karşılaştırmıştır. Bu şekilde elde ettiği protein bazlı biyosensörlerle metalotiyonin, Merkür regülatör proteini ve mer R gibi proteinlerin ağır metale maruz kaldıktan sonraki kapasitans değişimlerini çalışmıştır. Deneyler sonucunda metale bağımlı olarak indüklenen dört farklı promotör kaseti geliştirilmiştir. Promotörlerin Cu(II), Cr(VI)/Cr(III) ve Pb(II)'ye karşı duyarlı bulunmaları, izlenen yaklaşımların doğruluğunu göstermiştir. Aynı metaller için yapılan protein bazlı biyosensör denemelerinde ise artan metal konsantrasyonlarına karşı kapasitansın değişimi gözlenmiştir. Her iki yaklaşımdan elde edilen sonuçlarda metal spesifik protein biyosensörlerin "whole cell" biyosensörlere göre daha spesifik oldukları, ancak whole cell biyosensörlerin de metallere sadece biyolojik olarak algılanabilen miktarlarını ölçmelerinden dolayı avantajlı olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan benzer bir çalışmada (Bontidean et al. 2000) *Synecoccus* 'dan izole edilip saflaştırılan metale dirençli proteinler Hg(II), Cu(II), Zn(II) ve Cd(II) metallere tespit etmek üzere kullanılmış ve kapasitans değişimlerinin ölçümlerine göre alınan sonuçlarda farklı metaller arasında çok fazla seçicilik gözlenmediği için, protein temelli tasarlanan ilgili biyosensörün pratik çalışmalar için henüz yeterli olmadığı ancak çalışmanın orijinal olması nedeniyle daha çok denemeye gereksinim duyulduğu belirtilmiştir.

2006 yılında yapılan bir çalışmada (Michel et al. 2006) Sitokrom c3 enzimini temel alan amperometrik bir biyosensörle Cr(VI) nitelik ve nicelik tayini yapılmış, aynı zamanda biyosensörün verimliliğini etkileyen sıcaklık, iyon aralığı, oksijen, metaller, bikarbonat ve

sülfat gibi dış koşulların etkisi araştırılmıştır. Biyosensörün cevap hızının 9-25 C° ile yapılan ölçüm aralığında sıcaklık arttıkça artışı görülmüş ve optimum pH 7.6 olarak belirlenmiştir. 0-0.2 M iyon aralığında; 0.1 M' a kadar duyarlılığın düştüğü, daha yüksek değerlerde ise sabit kaldığı tespit edilmiştir. Çözünmüş oksijen, konsantrasyon tayinine engel olduğu için sisteme nitrojen gazı salınımı önerilmiştir. Bikarbonatın biyosensör performansı üzerine etki etmediği ve Mn(VII), Mo(VI), V(V), W(VI) gibi metallere karşı biyosensörün çok düşük duyarlılığa (kroma göre) sahip olduğu bulunmuştur. Geliştirilen biyosensörün Cr(VI) dışındaki metallere düşük duyarlılıkla da olsa bağlanabilmesi, biyosensörün hassasiyetini düşürse de, daha ileriki safhalarda geliştirilen biyosensörün düşük sülfat içerikli yer altı sularında kromatın miktar tayini için kullanılabileceği önerilmiştir.

Biyosensörler kontaminantın toplam miktarını değil sadece biyolojik olarak algılanabilen miktarını ölçerler. Biyosensörle yapılan ölçümleri kontrol etmek için kurşunun biyolojik olarak algılanabilir miktarını düşürdüğü bilinen bir şelat ajan kurşunlu solüsyona eklenmiştir. Şelat ajan içeren kurşun solüsyonundan alınan ölçüm değerleri, sadece kurşun içeren solüsyondan alınan ölçüm değerleri ile karşılaştırılmıştır. Solüsyondaki algılanabilir kurşun konsantrasyonu düştükçe biyosensörün ürettiği lüminesans ışığın da düştüğü kaydedilmiştir. Bu sonuç biyosensörün, kontaminantın biyolojik olarak algılanabilen miktarına karşı duyarlı olduğunu ve lüminesansın da bu miktara bağlı tepki verdiğini göstermektedir (Tauriainen et al. 2000).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalar süresince kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım amaçları aşağıda sıralandığı gibidir.

| <b>Kullanılan madde</b> | <b>Kullanım amacı</b>  |
|-------------------------|--|
| Agar                    | Mikroorganizmaların uzun süreli muhafazaları için hazırlanan stok besiyeri ortamlarına katılaştırma amacıyla eklenmiştir.                  |
| Amonyak                 | Destek elektrolit çözeltilerinin etkilerinin araştırılması sırasında, amonyak çözeltisinin hazırlanması için kullanılmıştır.               |
| Amonyum klorür          | Destek elektrolit çözeltilerinin etkilerinin araştırılması sırasında, amonyak klorür tampon çözeltisinin hazırlanması için kullanılmıştır. |
| Asetik asit             | Asetik asit/ sodyum asetat tampon çözeltisi yapımında kullanılmıştır.  |
| Azot gazı               | Ölçüm solüsyonlarındaki çözünmüş gazların uzaklaştırılmasında kullanılmıştır.  |
| Bakır nitrat            | Uygun konsantrasyonlarda hazırlanarak hedef madde olarak kullanılmıştır.   |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Çinko nitrat          | Girişim etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır.                     |
| Etanol                | Bazı sterilizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.                          |
| Formaldehit           | <i>R. arrhizus</i> ' un inaktive edilmesinde kullanılmıştır.             |
| Glukoz                | Mikroorganizma geliştirme besiyerinde kullanılmıştır.                    |
| Grafit tozu           | Karbon pastası yapımında kullanılmıştır.                                 |
| Hidroklorik asit      | pH ayarlamalarında kullanılmıştır.                                       |
| Kobalt nitrat         | Girişim etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır.                     |
| Kurşun nitrat         | Uygun konsantrasyonlarda hazırlanarak hedef madde olarak kullanılmıştır. |
| Mineral yağ           | Karbon pastası yapımında kullanılmıştır.                                 |
| Nikel nitrat          | Girişim etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır.                     |
| Nitrik asit           | pH ayarlamalarında kullanılmıştır.                                       |
| Nutrient broth        | Bakteri üretiminde ana besiyeri olarak kullanılmıştır.                   |
| Patates dekstroz agar | Saf kültürleri stoklamak amacıyla kullanılmıştır.                        |
| Pepton                | Mikroorganizma geliştirme besiyerinde kullanılmıştır.                    |

|                        |   |
|------------------------|---|
| Potasyum hidroksit     | pH ayarlamalarında kullanılmıştır.                                    |
| Doygun potasyum klorür | Referans elektrodun hazırlanması/muhafazası sırasında kullanılmıştır. |
| Sodyum asetat          | Asetik asit/ sodyum asetat tampon çözeltisi yapımında kullanılmıştır. |
| Sodyum hidroksit       | pH ayarlamalarında kullanılmıştır.                                    |
| Sodyum nitrat          | Destek elektrolit çözeltisi olarak kullanılmıştır.                    |
| Tris hidroklorik asit  | Destek elektrolit çözeltisi olarak kullanılmıştır.                    |
| Trisma base            | Destek elektrolit çözeltisi yapımında kullanılmıştır.                 |
| Yeast                  | Mikroorganizma geliştirme besiyerinde kullanılmıştır.                 |

### 3.1.2. Kullanılan mikrobiyolojik materyaller

Çalışmada mikrobiyolojik materyal olarak kullanılan *R. mucilaginosa*, *R. arrhizus* ve *P. aeruginosa* isimli mikroorganizmalar Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. İlgili türlere ait bilimsel sınıflandırma Çizelge 3.1.' de verildiği gibidir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan mikrobiyal türlerin bilimsel sınıflandırılmaları

|                 | <i>R. mucilaginosa</i> | <i>R. arrhizus</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
|-----------------|------------------------|--------------------|----------------------|
| <b>Alem</b>     | Fungi                  | Fungi              | Bacteria             |
| <b>Şube</b>     | Basidiomycota          | Zygomycota         | Proteobacteria       |
| <b>Sınıf</b>    | Sporidiales            | Zygomycetes        | Gamma Proteobacteria |
| <b>Takım</b>    | Sporidiobolaceae       | Mucorales          | Pseudomonadales      |
| <b>Familiya</b> | Pseudomonadaceae       | Mucoraceae         | Pseudomonadaceae     |
| <b>Cins</b>     | Rhodotorula            | Rhizopus           | Pseudomonas          |

### 3.1.3. Kullanılan cihazlar ve teçhizatlar

Çalışmalar süresince kullanılan tüm cihaz/teçhizatlar ve kullanım amaçları aşağıda verildiği gibidir.

| <b>Cihaz/Teçhizat</b>      | <b>Marka</b>   | <b>Kullanım amacı</b>  |
|----------------------------|----------------|--|
| Ag/ AgCl referans elektrot | <i>CHI660B</i> | Elektrokimyasal çalışmalarda referans elektrot olarak (doygun KCl) kullanılmıştır. |
| Buzdolabı                  | <i>Arçelik</i> | Çözeltilerin ve mikroorganizmaların muhafazasında kullanılmıştır.                  |
| Etüv                       | <i>Nüve</i>    | Mikroorganizmaların sıcaklıkla kurutulmasında ve                                   |

|                             |                            |  |
|-----------------------------|----------------------------|--|
|                             | <i>FN400</i>               | bazı sterilizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.                          |
| İnkübatör<br>(Çalkalamalı)  | <i>Innova<br/>4230</i>     | Mikroorganizma üretimlerinde kullanılmıştır.                             |
| İnkübatör<br>(Statik)       | <i>Memmert</i>             | Mikroorganizma üretimlerinde kullanılmıştır.                             |
| Karbon pastası<br>elektrodu | -                          | Temel çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır.                           |
| Liyofilizatör               | <i>Edwards</i>             | Mikroorganizmaların liyofilizasyonunda kullanılmıştır.                   |
| Manyetik karıştırıcı        | <i>VELP</i>                | Elektrotların şartlandırılmasında kullanılmıştır.                        |
| Otoklav                     | <i>ALP</i>                 | Sterilizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.                               |
| PH metre                    | <i>Consort<br/>p500</i>    | Besiyeri ve elektrolit çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.    |
| Platin tel                  | <i>CHI660B</i>             | Karşıt elektrot olarak kullanılmıştır.                                   |
| Potansiyostat               | <i>CHI660B</i>             | Elektrokimyasal ölçümlerin yapılmasında kullanılmıştır.                  |
| SEM- EDS                    | <i>JEOL JSM-<br/>7000F</i> | Yüzey değişimlerinin gözlenmesinde ve elementel analizde kullanılmıştır. |
| Soğutmalı santrifüj         | <i>MPW 351R</i>            | Besiyerinden mikroorganizmaların ayrılmasında                            |



|                   |                 |  |
|-------------------|-----------------|--|
| Spektrofotometre  | <i>Shimadzu</i> | Mikroorganizma gelişiminin belirlenmesinde kullanılmıştır.           |
| Terazi            | <i>Metler</i>   | Bazı kimyasalların ve mikroorganizmaların tartımında kullanılmıştır. |
| Distile su cihazı | <i>GFL</i>      | Çeşme suyunun distile edilmesinde kullanılmıştır.                    |
| Vortex            | <i>STUART</i>   | Örnekleri karıştırmak amacıyla kullanılmıştır.                       |

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Destek elektrolit çözeltilerinin hazırlanması**

#### **3.2.1.1. Amonyak çözeltisi**

0.5 M'lık  $\text{NH}_3$  ve  $\text{NH}_4\text{Cl}$  çözeltilerinden sırasıyla 0.24 ml ve 999.76 ml alınarak karıştırılmış, uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0.1 M'lık  $\text{NH}_3$  ve/veya  $\text{HCl}$  kullanılmıştır.

0.5 M  $\text{NH}_3$ : 37.84 ml  $\text{NH}_3$  1000 ml distile suyla tamamlanarak hazırlanmıştır.

0.5 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 26.745 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1000 ml suda çözünerek hazırlanmıştır.

#### **3.2.1.2. Asetik asit sodyum asetat tampon çözeltisi**

0.5 M'lık  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ve  $\text{CH}_3\text{COONa}$  çözeltilerinden sırasıyla 217.39 ml ve 782.61 ml alınarak karıştırılmış, uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0.1 M'lık  $\text{NaOH}$  ve/veya  $\text{HCl}$  kullanılmıştır.

0.5 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ : 28.50 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1000 ml distile suyla tamamlanarak hazırlanmıştır.

0.5 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ : 70 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1000 ml suda çözünerek hazırlanmıştır.

#### **3.2.1.3. Tris hidroklorik asit (Tris-HCl) tampon çözeltisi**

60.7 g Trizma base 1000 ml suda çözünerek hazırlanmıştır ve uygun pH değerini elde etmek üzere konsantre  $\text{HCl}$  çözeltisi kullanılmıştır.

#### **3.2.1.4. Sodyum nitrat çözeltisi**

42 g  $\text{NaNO}_3$  1000 ml suda çözünerek hazırlanmıştır, uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0.1 M'lık KOH ve/veya  $\text{HNO}_3$  kullanılmıştır.

#### **3.2.1.5. Hidroklorik asit çözeltisi**

0.1 M HCl hazırlamak üzere %37'lik HCl çözeltisinden 80.28 ml alınarak, üzeri son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.

#### **3.2.1.6. Nitrik asit çözeltisi**

0.1 M  $\text{HNO}_3$  hazırlamak üzere %65'lik  $\text{HNO}_3$  çözeltisinden 6.93 ml alınarak, üzeri son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.

#### **3.2.2. Ağır metal solüsyonlarının hazırlanması**

Çalışmada kullanılan Pb(II), Cu(II), Zn(II), Ni(II) ve Co(II) ağır metalleri, ilgili metal nitrat tuzlarından son konsantrasyonları 0.1 M olacak şekilde stok çözeltiler halinde hazırlanmıştır. Stok ağır metal çözeltileri, hassas terazide  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 'den 0.33 g,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 'den 0.22 g,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 'den 0.19 g,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 'den 1.44 g ve  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 'den 1.44 g tartılarak, son hacimleri 10 ml olacak şekilde hazırlandıktan sonra, ağzı kapalı koyu renkli cam şişelerde serin yerde muhafaza edilmişlerdir. Farklı konsantrasyonlardaki ağır metal solüsyonları ise stok çözeltilerden uygun oranlarda seyreltme yapılarak hazırlanmıştır.

### 3.2.3. Mikrobiyolojik materyallerin hazırlanması

#### 3.2.3.1. *R. mucilaginosa*' nın hazırlanması

Çalışmaların yapıldığı laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan ve daha önceki çalışmalarda Cu(II)' a ilgisi olduğu tespit edilen (Ertuğrul et al. 2009) ve bir maya türü olan *R. mucilaginosa* suşu sensör yapımında biyolojik materyal olarak kullanılmıştır.

Stok olarak kullanılan PDA besiyerinden alınan örnekler 100 ml YPG besiyeri içeren (pH: 5) 250 ml' lik erlenlerde 30 °C' de ve 100 rpm hızla çalışan inkübatörde 8 gün süreyle geliştirilmiş ve optik yoğunlukları spektrofotometrik olarak(OD<sub>600</sub>) takip edilmiştir. Bu şekilde besiyerine alıştırılan ve gelişmeleri kontrol edilen maya hücreleri 400 ml besiyeri içeren 1000 ml' lik erlenlere 1 /100 ml oranında inoküle edilmiştir. 5 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilen biyokütle 5000 rpm de 10 dk boyunca santrifüjlenerek besiyeri ortamından ayrılmıştır. Biyokütle üzerindeki besiyeri artıklarını uzaklaştırmak için distile su ile yıkama yapılarak aynı koşullarda 2 kere daha santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen biyokütle liyofilize edilerek cam kaplarda kullanılabilecek kadar muhafaza edilmiştir.

#### 3.2.3.2. *R. arrhizus*' un hazırlanması

Çalışmaların yapıldığı laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan ve literatürde kurşuna yüksek ilgisi olduğu belirtilen (Sağ ve Kutsal 1997, Naja et al. 2005) *R. arrhizus* isimli küf mikrobiyal sensör yapımında biyolojik materyal olarak kullanılmıştır.

Stok olarak kullanılan Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerinden alınan *R. arrhizus* 100 ml Yeast Peptone Glucose (YPG) besiyeri içeren (pH: 5) 250 ml lik erlenlerde durgun ortamda 7 gün süreyle geliştirilmiştir. Gelişen kültür erlendenden alınarak 2 kere distile su ile yıkanmış ve sonra %1' lik formaldehit çözeltisi kullanılarak inaktive edilmiştir. Elde edilen biyokütle 110 °C de 24 saat kurutulduktan sonra (Aksu ve Gülen 2002) toz haline

getirilerek sensör yapımında kullanılmıştır. Kullanım dışında cam kaplarda serin ortamda muhafaza edilmiştir.

### **3.2.3.3. *P. aeruginosa*' nın hazırlanması**

Çalışmaların yapıldığı laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan ve literatürde kurşuna yüksek ilgisi olduğu belirtilen (Chang et al. 1992, Lin and Lai 2006) *P. aeruginosa* isimli bakteri mikrobiyal sensör yapımında biyolojik materyal olarak kullanılmıştır.

Stok olarak kullanılan NA besiyerinden alınan hücreler 100 ml NB besiyeri içeren (pH: 7) 250 ml' lik erlenlerde 35 °C' de ve 120 rpm hızla çalışan inkübatörde 3 gün süreyle aktive edilmiştir. Aynı koşullarda yüksek hacimde geliştirilen bakteriyel biyokütle 10.000 rpm' de 5 dk süreyle santrifüjlenerek besiyeri ortamından ayrılmıştır. Ayrılan pellet, üzerindeki besiyeri artıklarından arındırılmak üzere iki kere distile su ile yıkanmış ve cam petrilerde 70 °C' de 36 saat süreyle kurutulmuştur. Kurutma süreci sonunda cam petrilerden çelik spatüllerle kaldırılan kuru kütle porselen havanda toz haline getirilene kadar inceltirilmiştir. Kullanım dışında cam kaplarda serin ortamda muhafaza edilmiştir.

### **3.2.4. Karbon pastasının hazırlanması**

Deneyler süresince taze olarak hazırlanan karbon pastası cam kaplarda her 900 g grafit tozu için pastör pipetleriyle yaklaşık 20 damla mineral yağ kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanma süresince homojen dağılmış bir yapı elde etmek üzere karıştırma süresi 10-15 dk arasında değişmiştir.

Mikrobiyal hücrelerle modifiye edilen karbon pastasının yapımında öncelikle grafit tozu ve uygun miktarda tartılan mikrobiyal kütle karıştırılmış, mineral yağ son aşamada ilave edilerek pasta haline getirilmiştir.

Modifiye karbon pastaları, her 100 mg grafit tozu için, sıcaklıkla kurutulmuş *R. arrhizus*

hücrelerinden 10 mg, liyofilize *R. mucilaginosa* hücrelerinden ve *P. aeruginosa* hücrelerinden 5'er mg (%w/w) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

### **3.2.5. Çalışma elektrotlarının hazırlanması**

Çalışma elektrodu olarak çapı 5 mm, boyu 7 cm olan ve elektriksel iletkenliği sağlamak için iç kısmında pirinç bir tel bulunduran teflon elektrot kullanılmıştır. Elektrodun uç kısmı karbon pastasının yerleştirilmesi için 3 mm çap ve derinlikte bir hazneye sahiptir. Tüm çalışmalar aynı çalışma elektroduyla gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan karbon pastası, elektrodun gövdesine çelik bir spatül yardımı ile yerleştirildikten sonra yüzeyi kaygan ve düz bir zeminde pürüzsüzleştirilmiştir. Kontrol olarak, mikrobiyal kültür içermeyen ancak ilgili ağır metali içeren destek elektrolit solüsyonlarında şartlandırılan ve mikrobiyal kültür içeren ancak metal içermeyen destek elektrolit çözeltilerinde şartlandırılan elektrotlar kullanılmıştır. Bu şekilde, kullanılan mikrobiyal türlerin ve ağır metallerin elektrokimyasal alanda oluşturduğu farklar kontrollü bir şekilde gözlenmiştir.

### **3.2.6. Analiz yöntemleri**

#### **3.2.6.1. Mikroorganizmaların gelişimlerinin belirlenmesi**

Yukarıda belirtilen koşullarda inkübe edilen *R. mucilaginosa'* nın gelişimi erlenlerden inkübasyon süresi boyunca her gün örnek alınarak, spektrofotometrik yöntemle 600'nm de ölçülerek takip edilmiştir. Alınan örnekler 5.000 rpm' de santrifüjlendikten sonra süpernatant kısım atılmış, kalan pellet kısmı fizyolojik tuzlu su ile tamamlanıp karıştırıcıda çalkalanarak ve gerektiği durumda seyreltilerek ölçümü gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.6.2. Dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar

Hedef ağır metallerin hangi potansiyel aralığında nasıl bir elektrokimyasal davranış sergilediğini gözlemek üzere; basit, güvenilir ve kısa sürede cevap veren, avantajlı bir yöntem olması sebebiyle elektrokimyasal çalışmalarda sıklıkla kullanılan dönüşümlü voltametri tekniği kullanılmıştır. Ölçümlerden önce elektrokimyasal hücreden 1-3 dk boyunca azot gazı geçirilerek, içerisindeki çözülmüş gazların giderilmesi sağlanmıştır. Elde edilen bilgiler doğrultusunda ilgili analitin hangi potansiyelde optimum cevabı verdiği gözlemlenerek sonraki çalışmalara bu potansiyel aralığı temel alınarak devam edilmiştir. Her bir mikrobiyal tür için uygulanan dönüşümlü voltametri parametreleri aşağıda belirtildiği gibidir:

*R. mucilaginosa* ile yapılan dönüşümlü voltametri çalışmaları:

Dönüşümlü voltametri çalışmaları için *R. mucilaginosa* ile modifiye edilmiş ve edilmemiş iki farklı karbon pastası kullanılmıştır. Modifiye karbon pastası; 5.0 mg liyofilize edilmiş *R. mucilaginosa*, 30 mg mineral yağ ve 65 mg grafit tozu, non-modifiye pasta; 30 mg mineral yağ ve 70 mg grafit tozu ile hazırlanmıştır. Hazırlanan pastalar elektrot üzerindeki boşluğa doldurulmuş ve elektrot yüzeyi kâğıt üzerinde düzleştirilerek kullanılmıştır. Şartlandırma  $1.0 \times 10^{-3}$  M Cu (II). içeren 15 ml 0.05 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisinde, sürekli karıştırmalı ortamda 15 dk süreyle gerçekleştirilmiştir. Şartlandırmadan sonra yüzeyi distile suyla dikkatlice yıkanan elektrotlar klasik üç elektrotlu elektrokimyasal ölçüm hücresine yerleştirilmiş ve +0.6 ile -0.8 V aralığında, 100 mV/s tarama hızında analizleri yapılmıştır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Eşit koşullarda şartlandırılan modifiye ve non-modifiye elektrotların dönüşümlü voltametri sonuçları karşılaştırılarak mikrobiyal materyalin ağır metal adsorbsiyonundaki etkisi gözlenmiştir.

*R. arrhizus* ile yapılan dönüşümlü voltametri çalışmaları:

Modifiye karbon pastası; 10 mg sıcaklıkla kurutulmuş *R. arrhizus*, 90 mg grafit tozu ve uygun miktarda parafin yağının homojen bir şekilde karıştırılması ile hazırlanmış, 5 mm

apındaki elektrot gövdesine yerleştirilmiş ve yüzeyi pürüzsüz hale getirildikten sonra kullanılmıştır. Non-modifiye elektrot için hazırlanan karbon pastasına mikrobiyal biyokütle eklenmemiştir. Dönüşümlü voltametri çalışmaları  $1.0 \times 10^{-4}$  M Pb(II) içeren, 20 ml 0.01 M lık Tris-HCl tampon çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Hem modifiye hem de non- modifiye elektrotlar için +1.5 ve -1.5 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızı uygulanmıştır. şartlandırma, karıştırmalı ortamda 15 dk süresince yapılmıştır. Diğer temel hazırlık basamakları, kullanılan elektrokimyasal hücre ve elektrotlar ise *R. mucilaginosa* ile yapılan çalışmalarla eşit koşullardadır.

*P. aeruginosa* ile yapılan dönüşümlü voltametri alışmaları:

Sıcaklıkla kurutulmuş *P. aeruginosa* biyokütlesinden 5.0 mg ve grafit tozundan 95 mg içeren karışım uygun miktarda mineral yağ ile pasta haline getirildikten sonra elektrot boşluğuna yerleştirilmiş ve yüzeyi dzgnleştirildikten sonra kullanılmıştır. Mikrobiyal biyokütle eklemeden yapılan non- modifiye elektrotlar diğer voltametrik çalışmalarda olduğu gibi kontrol amaçlı kullanılmıştır. Dönüşümlü voltametri çalışmaları  $1.0 \times 10^{-4}$  M Pb(II) içeren, 20 ml 0.05 M lık asetik asit/ sodyum asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ ) tampon çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Hem modifiye hem de non- modifiye elektrotlar için +1.5 ve -1.5 V potansiyel aralığında 70 mV/s tarama hızı uygulanmıştır.

### **3.2.6.3. Sıyırma voltametrisi tekniği kullanılarak yapılan alışmalar**

Dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak hedef analitlerin hangi potansiyel aralıklarında cevap verdikleri belirlendikten sonra, kantitatif analizler için daha hassas bulunan ve düşük tayin sınırlarına ulaşabilen sıyırma voltametrisi tekniği kullanılarak elektrokimyasal cevabın optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu alışmalar, farklı destek elektrolit çözeltilerinin ve bu çözeltilerin pH aralıklarının, iyonik konsantrasyonlarının etkisini, çöktürme potansiyelinin ve çöktürme süresinin etkisini, şartlandırma süresinin etkisini ve girişim yapabilecek maddelerin etkisini içermektedir. Tüm sıyırma voltametrisi çalışmalarında çalışma elektrodu olarak mikrobiyal kültürlerle modifiye edilen karbon pastası elektrodu, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrodu ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır.



Ölçümlerden önce elektrokimyasal hücreden 1-3 dk boyunca azot gazı geçirilerek, içerideki çözünmüş gazların giderilmesi sağlanmıştır.

#### **3.2.6.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan çalışmalar**

Taramalı elektron mikroskobu katı yüzeyler hakkında morfolojik ve topografik bilgi sağlayan, yüzeylerin davranışlarının anlaşılmasını kolaylaştıran bir yöntemdir (Newbury et al. 1990).

Dönüşümlü voltametri ve sıyırma voltametri ile elde edilen elektrokimyasal bulguları desteklemek amacıyla, elementel analiz cihazı ile kombine edilmiş SEM cihazı kullanılarak, *R. mucilaginosa* ve *R. arrhizus* için, modifiye ve non- modifiye yüzeylerin fiziksel nitelikleri hakkında bilgiler sağlanmıştır. Mikrobiyal adsorbsiyona bağlı olarak yüzeyde biriken analit maddeler elementel analiz ile tayin edilmiş ve büyüklükleri x100 ile x35.000 arasında değişen mikrograflar elde edilmiştir. SEM- EDS analizleri için çapı ve yüksekliği 1 cm, bir ucu 3 mm çap ve derinlikte bir hazneye sahip pirinç diskler kullanılmıştır. Hazırlanan karbon pastası bu diskler içine yerleştirildikten sonra yüzeyleri düzleştirilmiş ve ilgili destek elektrolit çözeltisini ve analitleri içeren ortamlarda, açık potansiyelde belirli sürelerde şartlandırıldıktan sonra yüzeyleri yıkanarak analizleri yapılana kadar cam petrielerde muhafaza edilmişlerdir.

*R. mucilaginosa* için yapılan çalışmada;  $1.0 \times 10^{-3}$  M Cu(II) içeren 0.05 M 15 ml NaNO<sub>3</sub> çözeltisinde (pH: 7.0) karıştırılmadan 15 dk süreyle açık potansiyelde şartlandırılan diskler kullanılmıştır. Kullanılan liyofilize edilmiş mikrobiyal kütle miktarı her 100 mg grafit tozu için 5 mg' dır (%w/w).

*R. arrhizus* için yapılan çalışmada;  $5.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) içeren 0.01 M 20 ml Tris-HCl tampon çözeltisinde (pH: 7.5), karıştırılmalı ortamda 15 dk süreyle şartlandırılan diskler kullanılmıştır. Kullanılan sıcaklıkla kurutulmuş mikrobiyal kütle miktarı 100 mg grafit tozu için 10 mg' dır (%w/w).

### 3.2.7. Elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisi araştırılan faktörler

#### 3.2.7.1. Tarama hızı

*R. mucilaginosa* ile yapılan çalışmada dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak tarama hızının elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma için kullanılan çözeltiler ve deneysel parametreler aşağıda verildiği gibidir:

Destek elektrolit çözeltisi: 15 ml 0.05 M NaNO<sub>3</sub> (pH: 7)

Şartlandırma çözeltisi: 1.0×10<sup>-3</sup> M Cu(II) içeren, 15 ml 0.05 M NaNO<sub>3</sub> (pH: 7)

Şartlandırma: Açık potansiyelde, 15 dk süreyle karıştırmalı ortamda

Denenen tarama hızları: 40, 60, 80, 100 ve 120 mV/s

#### 3.2.7.2. Destek elektrolit çözeltileri

*R. mucilaginosa* ile Cu(II) tayini üzerine yapılan çalışmalarda destek elektrolit çözeltisi olarak 0.05 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılmıştır. Optimum pH değeri bulunana kadar yapılan tüm deneylerde çözelti pH' sı 7.0 olacak şekilde ayarlanarak kullanılmıştır. Elektrotlar 15 dk süreyle açık devre potansiyelde şartlandırıldıktan sonra elektrokimyasal analizleri sıyırma voltametri tekniği ile yapılmıştır.

*R. arrhizus* ile Pb(II) tayini üzerine yapılan çalışmalarda arka plan gürültüsü en az olan ve metali en belirgin şekilde tayin eden destek elektrolit çözeltisini seçmek üzere amonyak (NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl), nitrik asit (HNO<sub>3</sub>), asetat (CH<sub>3</sub>COOH/ CH<sub>3</sub>COONa), sodyum nitrat (NaNO<sub>3</sub>) ve tris hidroklorik asit (Tris-HCl) çözeltileri, konsantrasyonları 0.05 M olacak ve 1.0×10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda Pb(II) içerecek şekilde hazırlanarak kullanılmışlardır.

Elektrotlar 12 dk süreyle açık devre potansiyelinde şartlandırıldıktan sonra elektrokimyasal analizleri sıyırma voltametri tekniği ile yapılmıştır.

*P. aeruginosa* ile yapılan çalışmalarda ise farklı destek elektrolit çözeltilerinin elektrokimyasal cevap üzerindeki etkilerini gözlemlemek üzere CH<sub>3</sub>COOH/ CH<sub>3</sub>COONa, Tris- HCl, NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl tamponları ve NaNO<sub>3</sub> çözeltileri, konsantrasyonları 0.05 M olacak ve 1.0×10<sup>-4</sup> M konsantrasyonda Pb(II) içerecek şekilde hazırlanarak kullanılmışlardır. Çalışmalar sıyırma voltametri tekniği ile yapılmış ve elektrotlar açık devre potansiyelinde şartlandırma süresi 10 dk olacak şekilde polarize edilmiştir.

### 3.2.7.3. Destek elektrolit çözeltisi pH' sı

Tüm çalışmalar sıyırma voltametri tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Gerekli tüm solüsyonlar çalışmalar sırasında taze olarak ve gerekirse stok solüsyonlardan seyreltilerek kullanılmışlardır.

*R. mucilaginosa* ile yapılan araştırmalar için pH' nın etkisi 0.05 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisinde 4.0 ve 8.0 aralığında denenmiştir. Çözeltileri uygun pH aralıklarına ulaştırmak için 0.1 M' lık KOH ve HNO<sub>3</sub> solüsyonları kullanılmıştır. Cu(II) konsantrasyonu denenilen tüm pH değerleri için 1.0×10<sup>-5</sup> M olacak şekilde sabit tutulmuştur.

*R. arrhizus* ile yapılan denemelerde pH etkisini araştırmak üzere 0.05 M ' lık Tris- HCl çözeltisi pH 3.0 ve 9.0 aralığında ve sabit bir Pb(II) konsantrasyonunda (1.0×10<sup>-5</sup> M) denenmiştir. Belirlenen pH değerlerini sağlamak üzere 0.1 M' lık KOH ve HCl solüsyonları kullanılmıştır.

*P. aeruginosa* ile yapılan çalışmalarda 0.05 M' lık CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa tampon çözeltisi pH' sı 3.5 ile 6.0 arasında olacak şekilde ayarlanarak kullanılmıştır. Tüm çalışmalar boyunca solüsyonlardaki Pb(II) konsantrasyonu, 1.0×10<sup>-5</sup> M olacak şekilde sabit tutulmuştur.

#### 3.2.7.4. Destek elektrolit çözeltisinin konsantrasyonu

*R. arrhizus'* un Pb(II) tayini için verdiği elektrokimyasal cevaplar üzerinde kullanılan destek elektrolit çözeltisinin iyonik aralığının ne yönde etki ettiğini araştırmak üzere, NaNO<sub>3</sub> çözeltisi 0.01 ile 0.5 M konsantrasyon aralıklarında denenmiştir.

*P. aeruginosa* için yapılan çalışmada ise iyonik aralığın etkisi 0.01 ile 0.4 M konsantrasyon aralığında  $2.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) için CH<sub>3</sub>COOH/ CH<sub>3</sub>COONa tampon çözeltisi kullanılarak denenmiştir.

#### 3.2.7.5. Şartlandırma süresi

Tüm deneyler açık devre potansiyeli altında, oda sıcaklığında ve karıştırmalı ortamda yapılmıştır. Bu parametrenin elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisini belirlemek üzere *R. mucilaginosa* ile 5 ve 60 dk arasında değişen sürelerin, *R. arrhizus* ile 3 ve 15 dk arasında değişen sürelerin ve *P. aeruginosa* ile 2- 16 dk aralığında değişen sürelerin etkileri sıyırma voltametri tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Deneyler süresince her bir mikroorganizma için kullanılan destek elektrolit çözeltisinin pH' ı ve iyonik aralığı sabit tutulmuştur.

Araştırmalar boyunca *R. mucilaginosa* çalışmalarında Cu(II) konsantrasyonu  $1.0 \times 10^{-3}$  M, *R. arrhizus* çalışmalarında Pb(II) konsantrasyonu  $1.0 \times 10^{-5}$  M ve *P. aeruginosa* çalışmalarında ise Pb(II) konsantrasyonu  $2.0 \times 10^{-5}$  M olacak şekilde sabit tutulmuştur.

#### 3.2.7.6. Depozisyon potansiyeli

Depozisyon/çöktürme potansiyelinin elektrokimyasal cevaplar üzerindeki etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmaların tamamında sıyırma voltametri tekniği kullanılmış, elektrot şartlandırmaları oda sıcaklığında açık devre potansiyelinde yapılmıştır. Her bir tür için ilgili destek elektrot çözeltilerinin pH, iyonik aralık değerleri optimum değerlerde tutulmuş, eşit şartlar altında sadece depozisyon potansiyelindeki değişimin elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

*R. arrhizus* ile modifiye edilmiş elektrotlarla bu parametrenin etkisi, sabit  $1.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) içeren Tris- HCl tampon solüsyonunda -1.3 ile -0.5 V arasındaki değerlerde araştırılmıştır.

*P. aeruginosa* ile yapılan çalışmalarda Pb(II) konsantrasyonu  $2.0 \times 10^{-5}$  M olacak şekilde sabit tutulup CH<sub>3</sub>COOH/ CH<sub>3</sub>COONa tampon çözeltilerinde denemeler yapılmıştır. Denenen çöktürme potansiyeli -1.6 ve -0.4 V aralığında seçilmiştir.

### 3.2.7.7. Depozisyon süresi

Elektrolit çözeltisi, pH, iyonik aralık ve depozisyon potansiyeli gibi deneysel koşulların optimum değerleri kullanılarak, elektrokimyasal cevabın depozisyon süresinden ne derece etkilendiği, sıyırma voltametri tekniği ile önceki deneylerle eşit ortam ve şartlandırma koşullarında araştırılmıştır.

İlgili parametre *P. aeruginosa* için; 0 ile 100 sn aralığında, Pb(II) konsantrasyonu  $2.0 \times 10^{-5}$  M olan CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa tampon çözeltisinde denenmiştir.

### 3.2.7.8. Farklı ağır metallerin girişim etkileri

Hedef maddelerin elektrokimyasal tayinine sinerjistik veya antagonistik olarak etki edebilecek ağır metal türlerinin etkileri, yukarıda bahsedilen parametrelerin her birinin optimum olduğu koşullarda, sıyırma voltametri tekniği ile araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda hedef maddenin tayini üzerinde, her bir metalin ayrı ayrı etkisi ve ortamda beraber bulunmaları durumundaki etkileri, farklı konsantrasyonlarda ağır metal içeren model solüsyonlar hazırlanarak araştırılmıştır.

*R. mucilaginosa* ile yapılan çalışma:

Ortamda sabit konsantrasyonda Cu(II) varken ( $1.0 \times 10^{-6}$  M), artan metal konsantrasyonlarının ( $1.0 \times 10^{-6}$  –  $1.0 \times 10^{-4}$  M aralığında) Cu(II)' in elektrokimyasal cevabı

üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Her bir metal için bu etki ayrı ayrı araştırılarak hangi metalin ne derece etki ettiği ortaya çıkarılmıştır.

Tüm ağır metallerin solüsyonda birlikte bulunmaları durumunda Cu(II) tayinini nasıl etkilediklerini gözlemlemek üzere hazırlanan model solüsyonların bir tanesi; her bir ağır metalden (Ni(II), Pb(II), Zn(II), Cu(II) )  $1.0 \times 10^{-6}$  M konsantrasyonda, diğeri ise yine her bir metalden  $5.0 \times 10^{-6}$  M konsantrasyonda içerecek şekilde hazırlanmıştır. Kontrol olarak kullanılan solüsyona ise hiçbir metal ilave edilmemiştir.

*R. arrhizus ile yapılan çalışma:*

Sabit miktarda ( $2.5 \times 10^{-6}$  M) Pb(II) içeren solüsyonlara kademeli olarak artan miktarlarda ( $2.5 \times 10^{-6}$  M-  $3.0 \times 10^{-5}$  M) Ni(II), Co(II), Zn(II) ve Cu(II) iyonları ayrı ayrı eklenerek, bu metallerin Pb(II) ' nin elektrokimyasal tayini üzerinde nasıl bir etki oluşturdukları araştırılmıştır.

Metallerin solüsyonda aynı anda birlikte bulunmaları durumunda Pb(II) tayini üzerinde gösterdikleri etkiyi araştırmak üzere aşağıda içerikleri verilen model solüsyonlar hazırlanmıştır:

- Hiçbir metal iyonu içermeyen kontrol solüsyonu
- Sadece Pb(II) içeren solüsyon:  $5.0 \times 10^{-6}$  M Pb(II)
- Tüm metalleri içeren birinci solüsyon:  $5.0 \times 10^{-6}$  şar M Pb(II) , Co(II), Ni(II), Cu(II) ve Zn(II)
- Tüm metalleri içeren ikinci solüsyon:  $5.0 \times 10^{-6}$  M Pb(II),  $10 \times 10^{-6}$  şar M Co(II), Ni(II), Cu(II) ve Zn(II)

- Tüm metalleri içeren üçüncü solüsyon:  $5.0 \times 10^{-6}$  M Pb(II),  $20 \times 10^{-6}$  şar M Co(II), Ni(II), Cu(II) ve Zn(II)

*P. aeruginosa ile yapılan çalışma:*

Diğer girişim etkisi çalışmalarından biraz daha farklı bir yol izlenerek, her bir metalin tek başına, Pb(II) ile birlikteyken (ikili metal solüsyonları), ve hepsi aynı anda ortamda bulunurken (çoklu metal solüsyonları) yaptıkları etkiler gözlenmiştir. Pb(II), bulunduğu solüsyonların tamamında tek bir sabit konsantrasyonda ( $1.0 \times 10^{-5}$  M) tutulmuş ve diğer metallerin Pb(II) ile oluşan pik akımı üzerindeki, negatif ve pozitif etkileri araştırılmıştır. Denenen metal konsantrasyonları araştırma bulguları bölümünde tablo olarak özetlenmiştir.

### **3.2.8. Kalibrasyon doğrularının elde edilmesi**

Tüm kalibrasyon eğrileri optimum deney koşulları altında, sıyırma voltametri tekniği kullanılarak elde edilmiştir. Belirlenen elektrokimyasal ve fizikokimyasal koşullar altında ilgili metal türleri için en düşük ve en yüksek tayin limitleri ortaya çıkarılmıştır. Kalibrasyon eğrileri en az 2 paralelli elektrokimyasal ölçümlerle elde edilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. *R. mucilaginosa* Kullanılarak Geliştirilen Mikrobiyal Biyosensör için Araştırma Bulguları

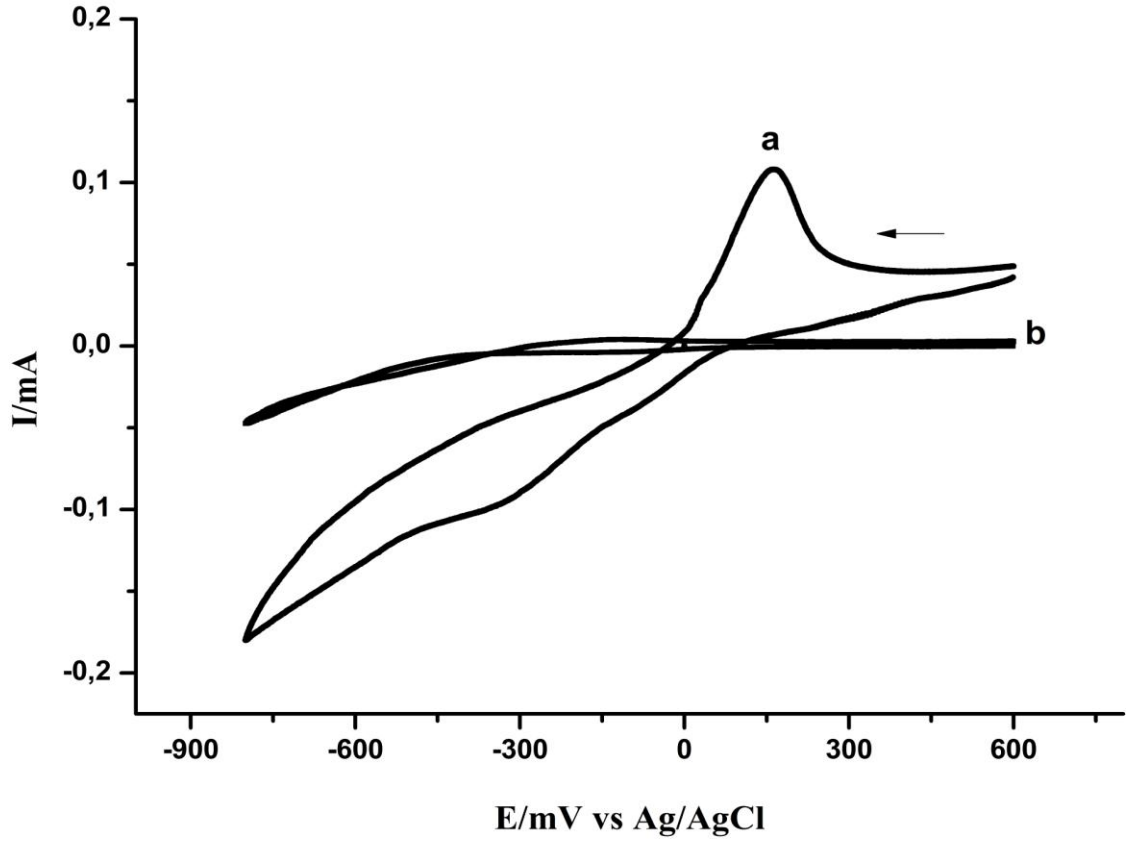
Liyofilize edilmiş *R. mucilaginosa* hücreleri kullanılarak geliştirilen Cu(II) seçici mikrobiyal sensörün optimum tayin koşulları aşağıda sunulduğu gibi detaylarıyla araştırılmıştır.

#### 4.1.1. CPE kullanılarak Cu(II) içeren şartlandırma ortamlarında dönüşümlü voltametri çalışmalarının gerçekleştirilmesi

Dönüşümlü voltametri çalışmaları için *R. mucilaginosa* ile modifiye edilmiş ve edilmemiş (non-modifiye) iki farklı karbon pastası kullanılmıştır. Modifiye edilen pasta 5.0 mg liyofilize edilmiş hücre, 30 mg mineral yağ ve 65 mg grafit tozu, non modifiye pasta 30 mg mineral yağ ve 70 mg grafit tozu ile hazırlanmıştır. Hazırlanan pastalar elektrot üzerindeki boşluğa yerleştirildikten sonra elektrot yüzeyi kağıt üzerinde düzgünleştirilmiş ve elektrokimyasal analizleri yapılmıştır. Destek elektrolit ve şartlandırma çözeltisi olarak  $1.0 \times 10^{-3}$  M Cu(II) içeren 15 ml 0.05 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılmıştır.

Hem modifiye hem de non-modifiye elektrotlar 15 dk süreyle, karıştırılan çözeltilerde şartlandırılmış ve dönüşümlü voltametri tekniği uygulanarak biyomateryal olarak kullanılan mikroorganizmanın bakır adsorbsiyonundaki etkisi araştırılmıştır (Şekil 4.1). Eşit koşullarda şartlandırılan modifiye ve non-modifiye elektrotların dönüşümlü voltametri sonuçları karşılaştırıldığında, kullanılan biyomateryalin bakır iyonlarının elektrot yüzeyine tutuklanmasında önemli bir etkisi olduğunu görülmektedir.

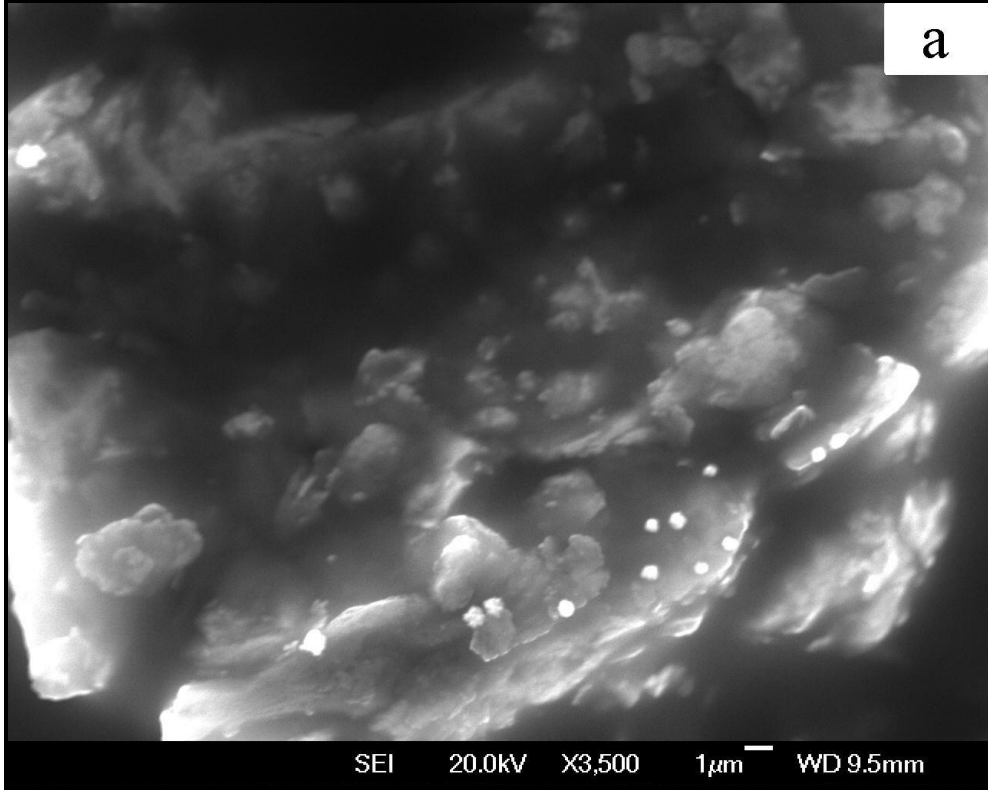




**Şekil 4.1** Modifiye edilmiş (a) ve edilmemiş (b) CPE elektrotlarının dönüşümlü voltamogramları (Cu(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-3}$  M, ölçüm çözeltisi: 0.05 M NaNO<sub>3</sub>, tarama hızı: 100 mV/sn, şartlandırma zamanı: 15 dk, yöntem: CV)

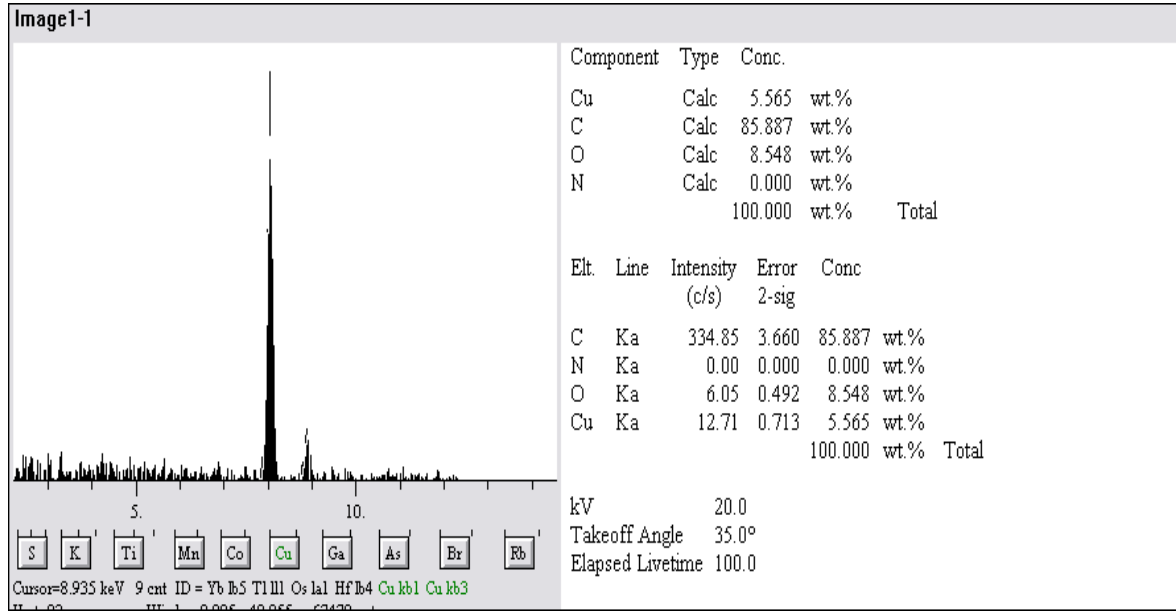
#### 4.1.2. Modifiye edilmiş ve bakırlı ortamda şartlandırılmış elektrodun SEM ile yüzey analizi

$1.0 \times 10^{-3}$  M Cu(II) içeren 0.05 M 15 ml NaNO<sub>3</sub> çözeltisinde karıştırılmadan 15 dk süreyle şartlandırılan elektrodun yüzeyinde meydana gelen modifikasyonlar taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiş ve elementel analizi yapılmıştır. x3500 ve x35.000 büyütme ile alınan taramalı elektron mikroskop görüntüleri Şekil 4.2a ve 4.2b' de; x35.000'lik görüntüye ait elementel analiz sonuçları ise Çizelge 4.1' de gösterilmiştir.



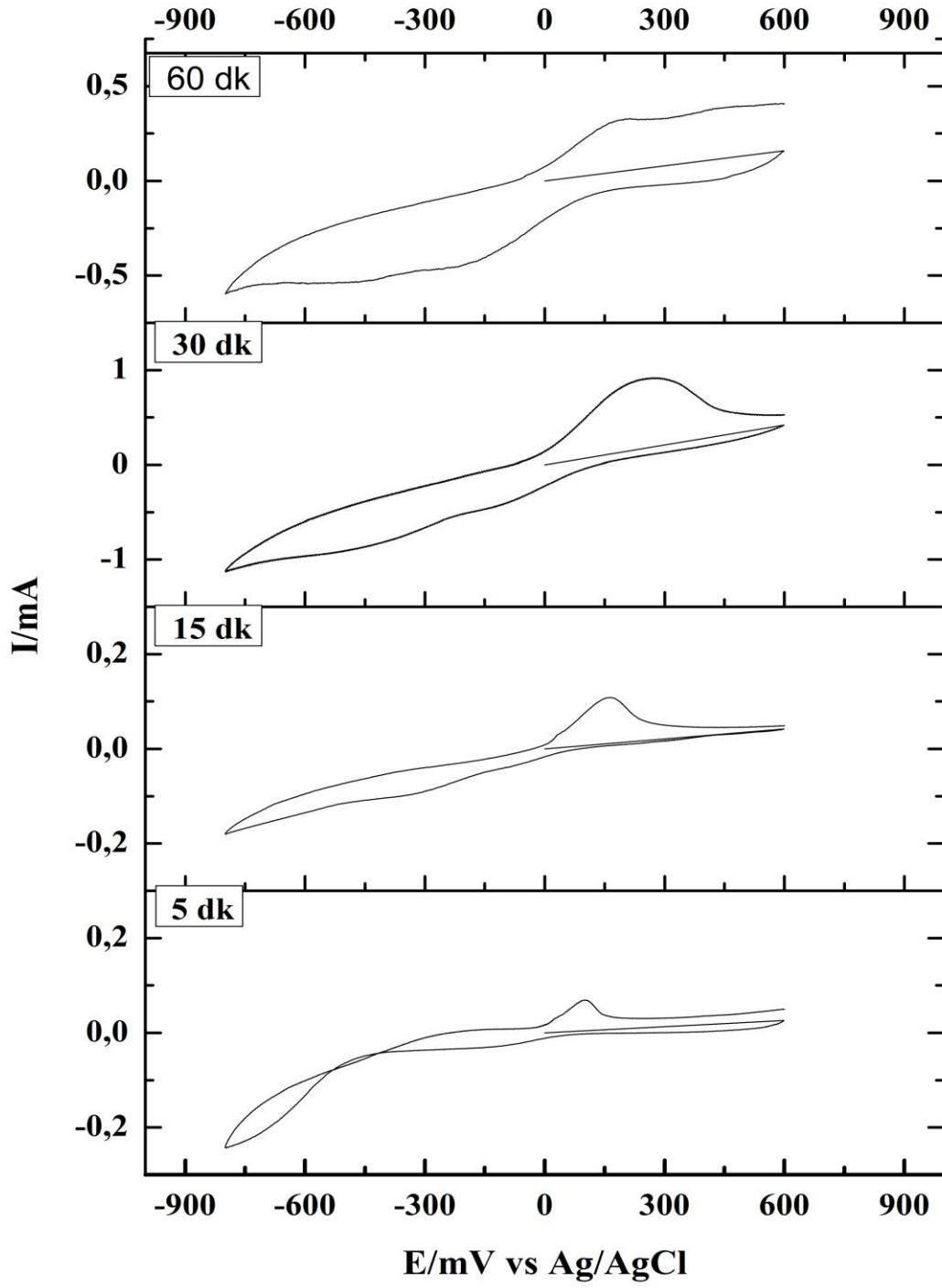
Şekil 4.2 *R. mucilaginosa* ile modifiye edilen elektrodun x3500 (a) ve x35.000 (b) büyütme ile çekilmiş SEM görüntüleri

**Çizelge 4.1** *R. mucilaginosa* ile modifiye edilen elektroda ait elementel analiz sonuçları

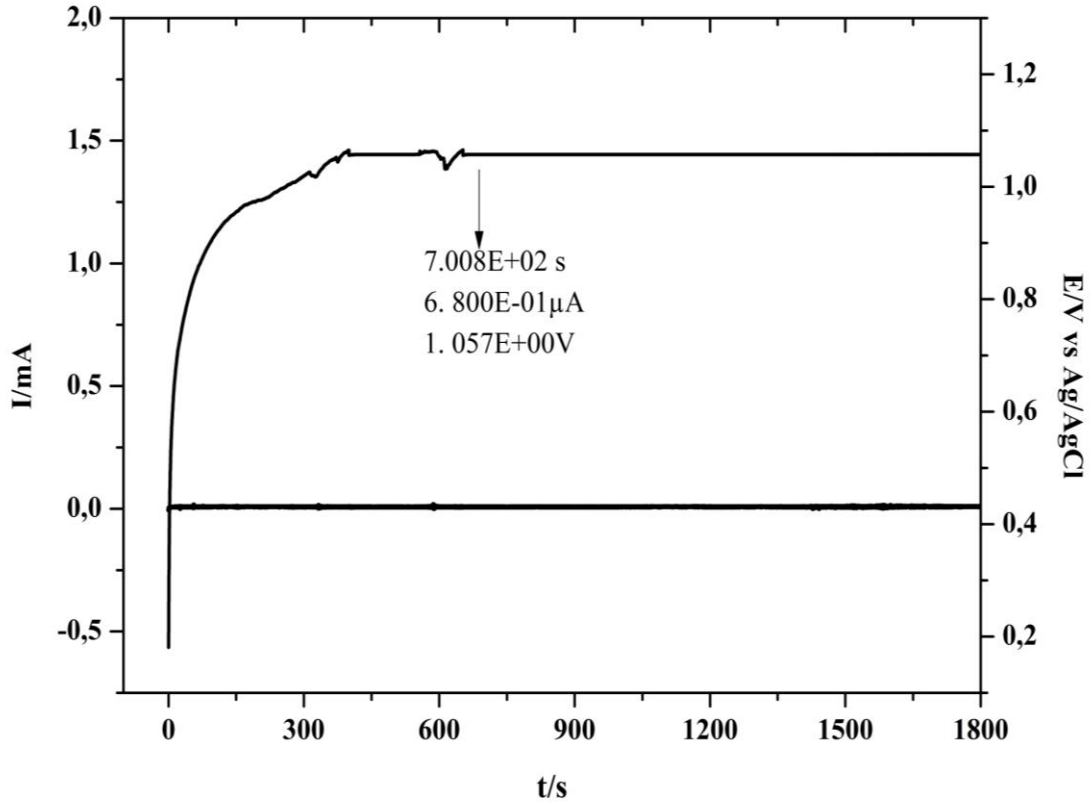


#### 4.1.3.Şartlandırma zamanının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi

Mikroorganizma yüzeyine bakır iyonlarının tutunmasını sağlayan fonksiyonel gruplar ve bu grupların adsorbsiyon kapasiteleri göz önüne alındığında, şartlandırma zamanının adsorbsiyon sürecinde önemli bir etkiye sahip olduğu söylenebilir. Bu nedenle 5, 15, 30 ve 60 dk'lık şartlandırma sürelerinde denemeler yapılmıştır. En iyi sonuca 15 dk'lık şartlandırma zamanında ulaşılmış ve sonraki deneyler için bu şartlandırma süresi kullanılmıştır. Şekil 4.3' de dört farklı şartlandırma süresi sonucunda elde edilen eğriler görülmektedir. Şekilden anlaşılacağı üzere 5 ve 15 dk'lık şartlandırma sürelerinde katodik bölgede belirgin pikler görülmüş ancak 30 ve 60 dk'lık şartlandırma sürelerinde pik belirginliği azalmış ve pik potansiyelinde kayma saptanmıştır.



Şekil 4.3 Şartlandırma süresinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

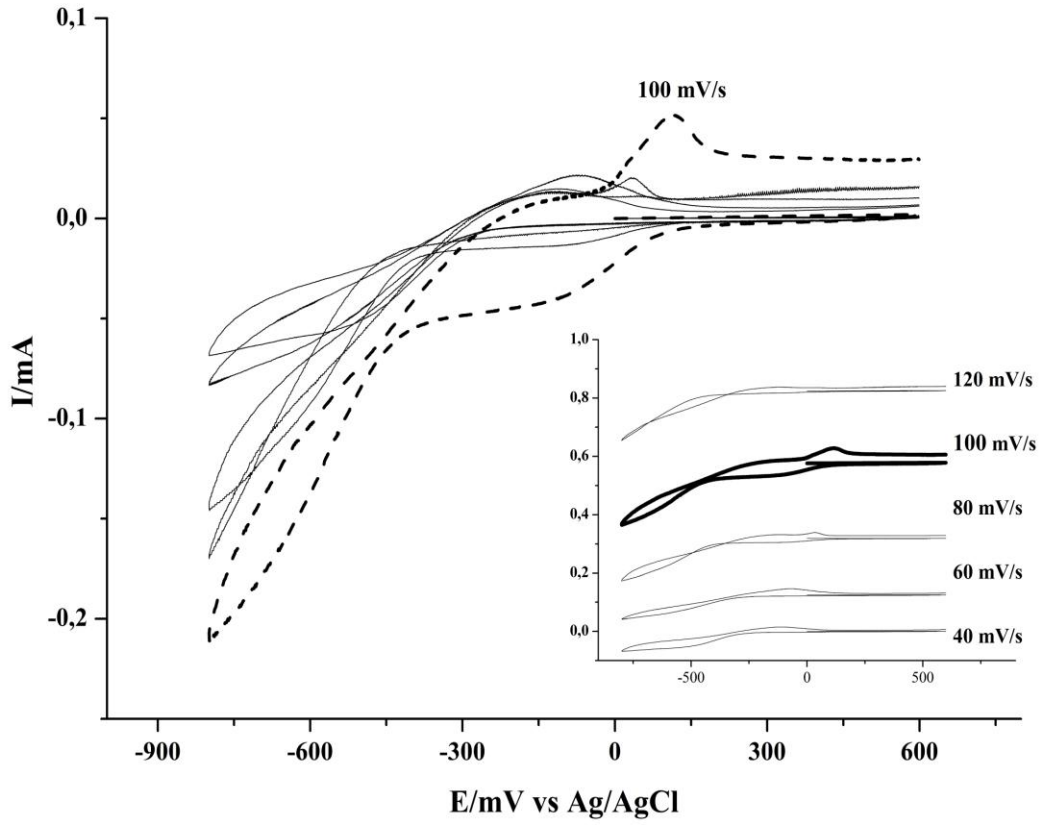


**Şekil 4.4** Şartlandırma süresinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

En uygun tayin zamanını belirlemek için yapılan iletkenlik ölçümü sonucunda sabit potansiyel altında, elektrot yüzeyinde yaklaşık 12 dk sonra akımın sabitlendiği görülmüştür (Şekil 4.4). Sonuç olarak en uygun tayin zamanı 15 dk olarak belirlenmiş ve sonraki deneyler için bu şartlandırma süresi kullanılmıştır.

#### **4.1.4.Tarama hızının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi**

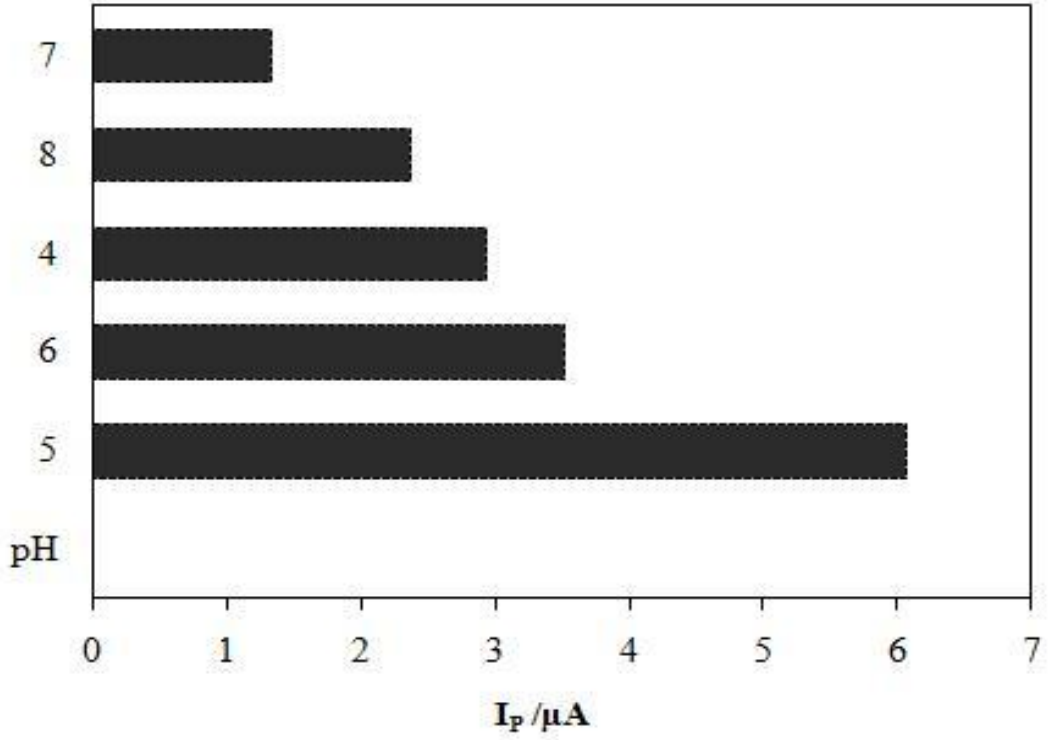
Farklı tarama hızlarının bakırın voltametrik tayini üzerindeki etkilerini belirlemek üzere 40-120 mV/s aralığında çalışmalar yapılmıştır.  $1.0 \times 10^{-3}$  M Cu(II) içeren çözeltilerde 15 dk süreyle şartlandırılan modifiye edilmiş elektrotların dönüşümlü voltametri tekniğinde 40, 60, 80, 100 ve 120 mV/s' lik tarama hızlarında verdikleri pikler Şekil 4.5' de gösterilmiştir. Tarama hızı arttıkça alınan pik akım değerleri 100 mV/s' e kadar yükselmiş, daha yüksek tarama hızlarında ise düşüş göstermiştir. En iyi sonuca 100mV/s' de ulaşılmıştır.



**Şekil 4.5** Tarama hızının voltametrik tayin üzerine etkisi (Cu(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-3}$  M, ölçüm çözeltisi: 0.05 M NaNO<sub>3</sub>, yöntem: CV)

#### 4.1.5.Şartlandırma çözeltisinin pH' sının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi

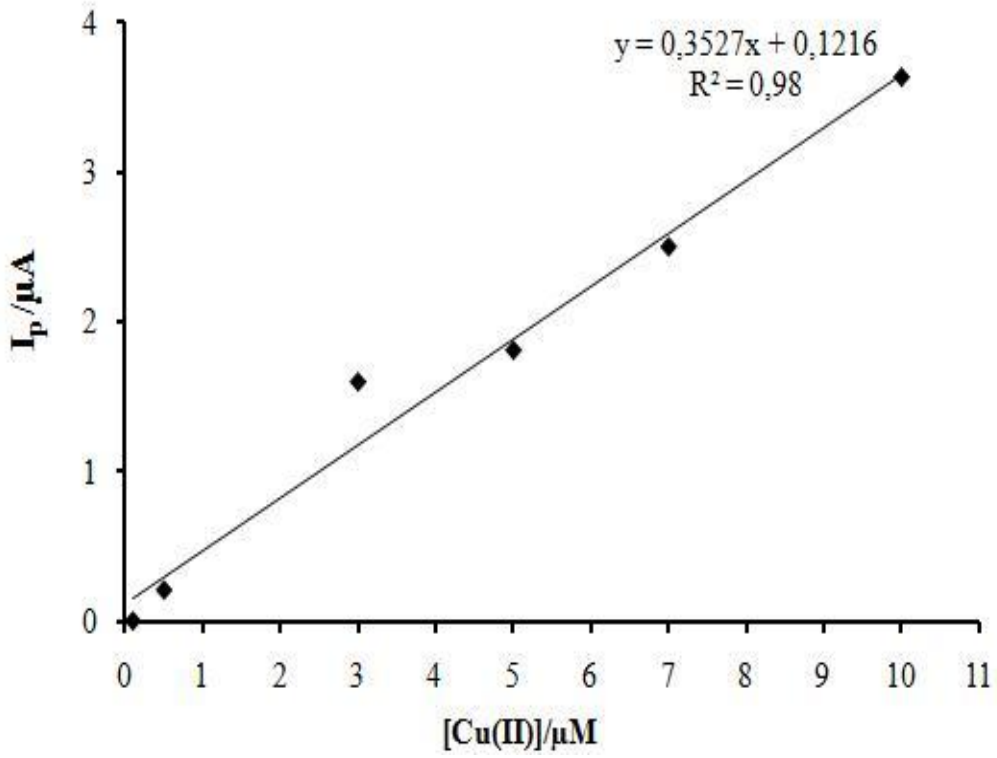
Şartlandırma çözeltisinin pH' sı çözeltideki metal iyonlarının çözünürlüğünü ve dolayısıyla iyonların biyolojik materyale tutunmasını etkilediği için, pH 4.0- 8.0 aralığında denemeler yapılarak optimum çalışma pH' sı tayin edilmiştir (Şekil 4.6). Yüksek pH değerlerinde yapılan denemelerde çözeltideki bakır iyonlarının büyük bir kısmı çökmüş ve düşük pik akımları gözlenmiştir. Daha düşük pH' larda yapılan denemelerde pik akımları yükselmiş ve pH 5.0' de en iyi sonuca ulaşılmış, sonraki çalışmalarda şartlandırma çözeltisinin pH' sı bu değere sabitlenmiştir.



**Şekil 4.6.** Şartlandırma çözeltisinin pH'ının elektrokimyasal tayin üzerine etkisi (Cu(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-3}$  M, ölçüm çözeltisi: 0.05 M NaNO<sub>3</sub>, şartlandırma süresi: 15 dk, tarama hızı: 100 mV/s, yöntem: DPSV)

#### 4.1.6. Geliştirilen model sensöre ait kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi

Geliştirilen mikrobiyal sensöre ait optimum koşullarda elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.7' de sunulmuştur. Bakır konsantrasyonu 0.1-10  $\mu$ M aralığında uygulanmış, 15 dk süreyle şartlandırılan çalışma elektrotlarının ölçümleri DPSV tekniği ile alınmıştır

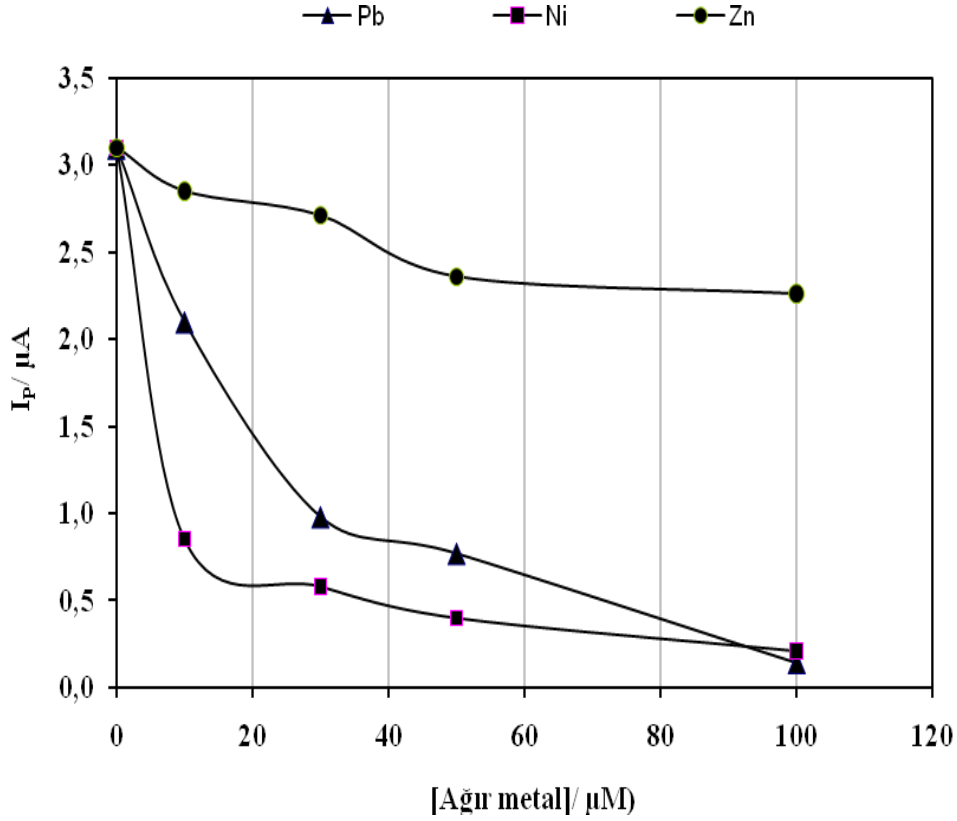


**Şekil 4.7** Geliştirilen model sensöre ait optimum koşullarda elde edilmiş kalibrasyon doğrusu (Cu(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-7}$ – $1.0 \times 10^{-5}$  M, şartlandırma süresi:15 dk, ölçüm çözeltisi: 0.05 M NaNO<sub>3</sub>, pH:5.0, yöntem: DPSV)

#### 4.1.7.Farklı ağır metallerin Cu(II) tayini üzerindeki tekli ve birlikte etkilerinin belirlenmesi

Ortamda farklı metallerin bulunması koşulunda, geliştirilen mikrobiyal sensörün bakıra karşı verdiği elektrokimyasal cevaplar araştırılmıştır. Ortamda sabit miktarda ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) Cu(II) varken, artan metal konsantrasyonlarının bakıra verilen cevap üzerindeki tekli etkileri Şekil 4.8' de verilmiştir. Diğer metallerin konsantrasyonu  $1.0 \times 10^{-6}$ – $1.0 \times 10^{-4}$  M aralığında arttırılmış ve alınan sinyaller eşit koşullarda yine DPSV tekniği ile araştırılmıştır.

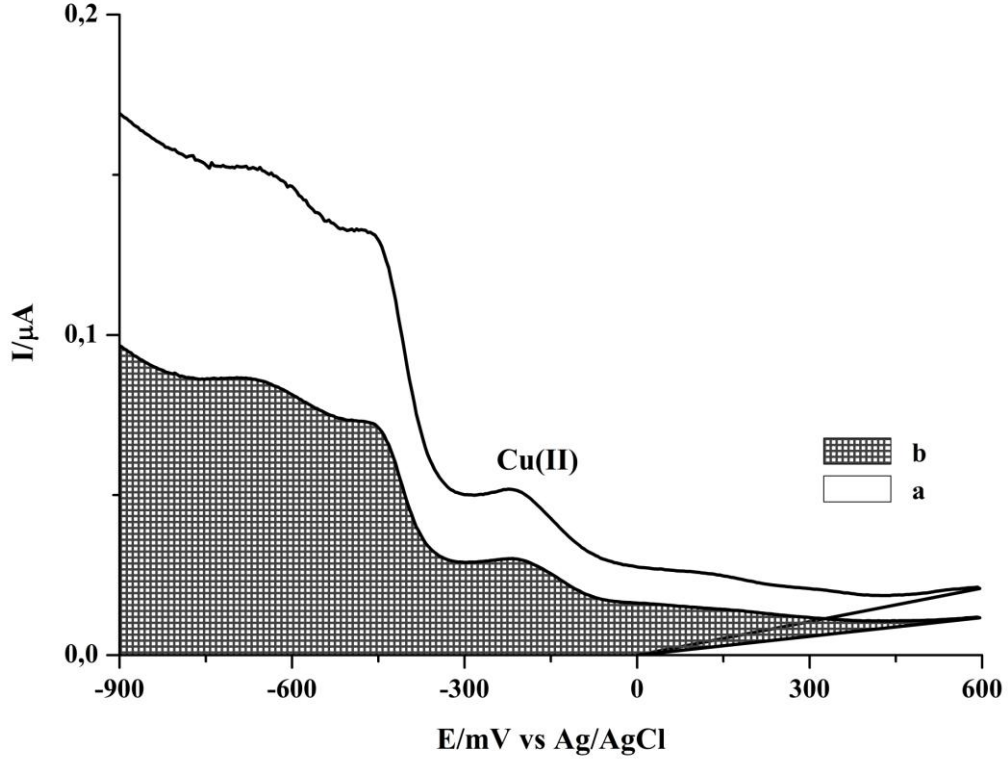




**Şekil 4.8.** Farklı metallerin mikrobiyal sensörün bakır tayini üzerine tekli etkileri (Cu konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-6}$  M, şartlandırma süresi: 15 dk, ölçüm çözeltisi: 0.05 M  $\text{NaNO}_3$ , pH:5.0, DPSV)

Bakırın elektrokimyasal tayinini en fazla etkileyen metaller Ni(II), Pb(II) olarak belirlenmiş, Zn(II) ise 100 kat fazla bulunduğunda bile bakır tayininde önemli bir etkiye neden olmamıştır. Ni(II) ve Pb(II) konsantrasyonları bakır konsantrasyonunun yaklaşık 30 katı kadar olduğunda bile bakıra ait pikler belirgin bir şekilde elde edilmiş daha yüksek konsantrasyonlarında ise elde edilen akım değerleri düşüş göstermiştir.

Şekil 4.9' da ise ortamda aynı anda farklı metallerin bulunması koşulunda geliştirilen mikrobiyal sensörün bakıra karşı verdiği cevap gösterilmektedir. Hazırlanan iki farklı çözeltiden alınan sonuçlar benzer şartlarda DPSV tekniği ile belirlenmiş ve metal içermeyen şartlandırma solüsyonu kontrol olarak kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilerin birincisi (Şekil 4.9a) eşit konsantrasyonda ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) Ni(II), Zn(II), Pb(II) ve Cu(II) içerirken ikinci solüsyon (Şekil 4.9b) aynı metalleri  $5.0 \times 10^{-6}$  M konsantrasyonda içermektedir. Ortamda farklı metal iyonlarının eşit konsantrasyonlarda bulunması durumunda bile geliştirilen mikrobiyal sensör bakırını belirgin bir şekilde tayin edebilmiştir.



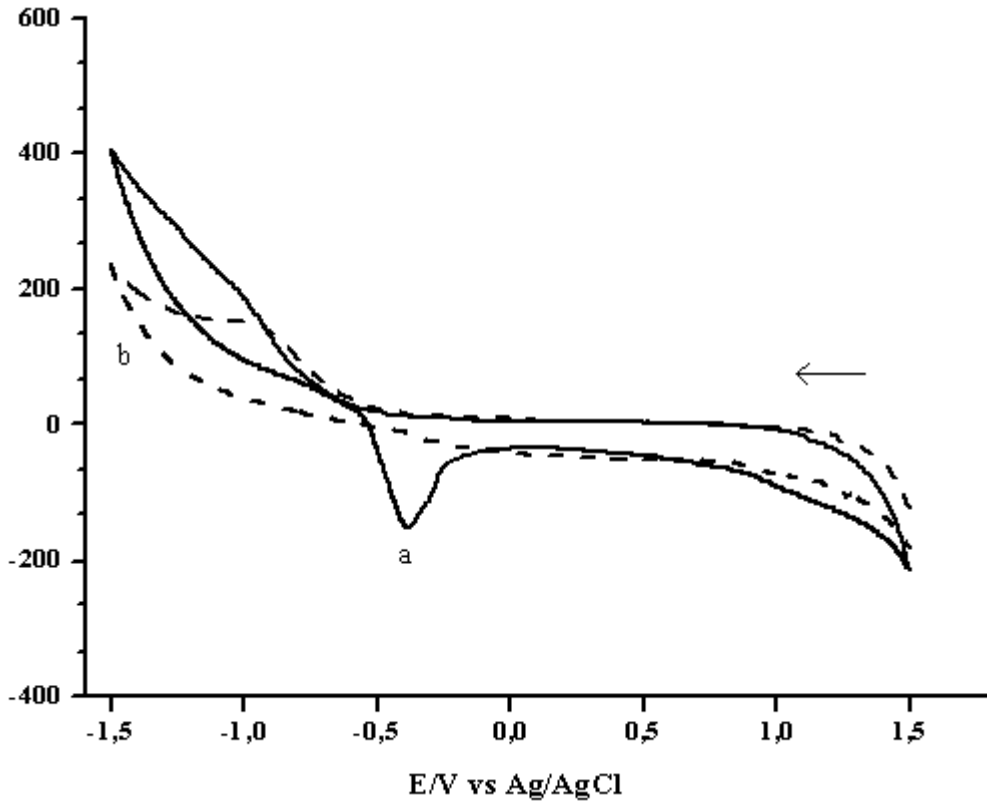
**Şekil 4.9** Farklı metallerin mikrobiyal sensörün bakır tayini üzerine birlikte etkileri (Metal konsantrasyonları: a)  $1.0 \times 10^{-6}$  M, b)  $5.0 \times 10^{-6}$  M, şartlandırma süresi: 15 dk, ölçüm çözeltisi: 0.05 M  $\text{NaNO}_3$ , pH:5.0, yöntem: DPSV)

## **4.2. *R. arrhizus* Kullanılarak Geliştirilen Mikrobiyal Biyosensör İçin Araştırma Bulguları**

Sıcaklıkla kurutulmuş *R. arrhizus* hücreleri kullanılarak geliştirilen Pb(II) seçici mikrobiyal sensörün optimum tayin koşulları aşağıda sunulduğu gibi detaylarıyla araştırılmıştır.

### **4.2.1. CPE kullanılarak Pb(II) içeren şartlandırma ortamlarında dönüşümlü voltametri çalışmalarının gerçekleştirilmesi**

Dönüşümlü voltametri çalışmaları  $1.0 \times 10^{-4}$  M Pb(II) içeren 0.01 M'lık Tris-HCl tampon solüsyonunda gerçekleştirilmiştir. Non-modifiye elektrotlardan elde edilen voltamogramlarda herhangi bir pik tespit edilmezken (Şekil 4.10b), *R. arrhizus* ile modifiye edilen elektrotların voltamogramlarında -0.6 ve -0.4 V aralığında kurşuna ait pik belirgin bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.10a). İlgili potansiyel aralığının kurşuna ait olduğu farklı çalışmalarda da gösterilmiştir (Wooleverand ve Dewald, 2001).

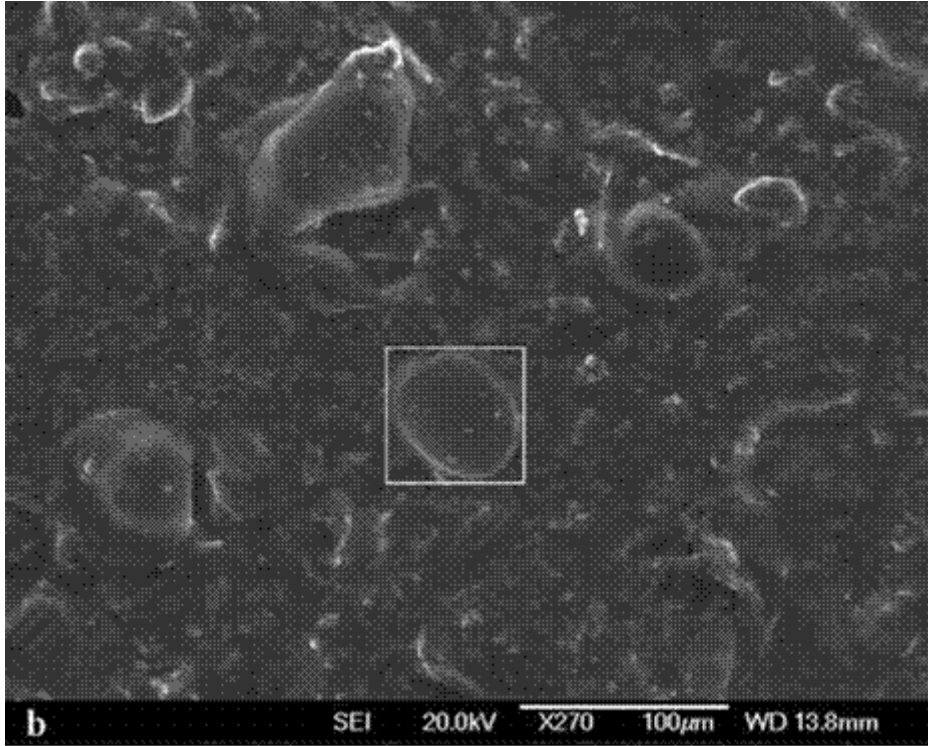
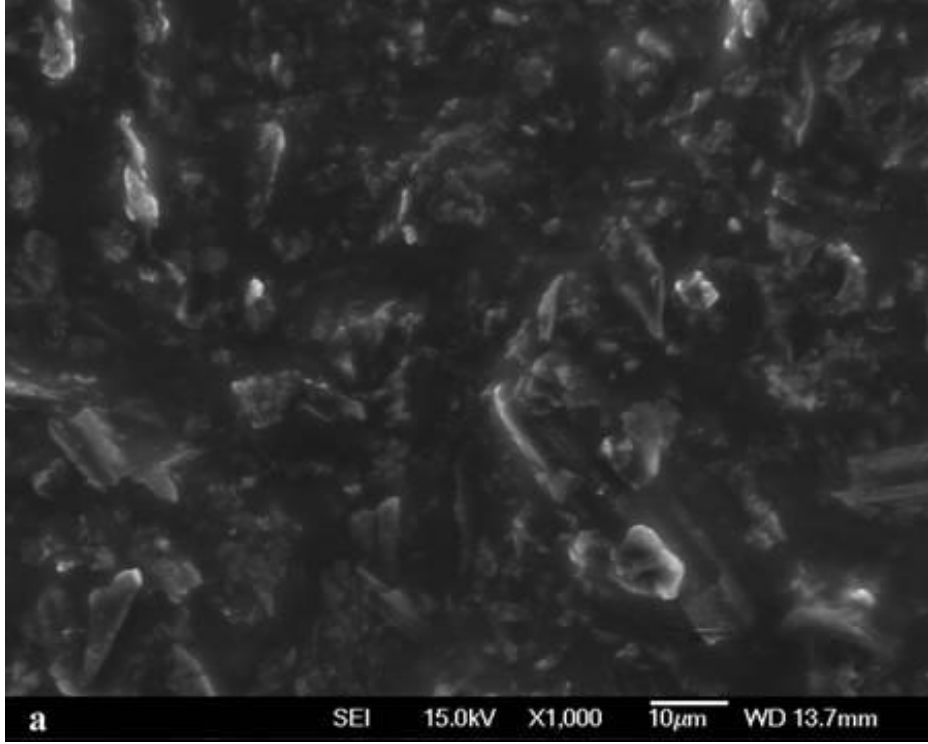


Şekil

4.10 Modifiye edilmiş ve edilmemiş CP elektrotlarının dönüşümlü voltamogramları (Pb(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-4}$  M, ölçüm çözeltisi: 0.01 M Tris-HCl, tarama hızı: 50 mV/sn, şartlandırma zamanı: 15 dk, yöntem: CV)

#### 4.2.2. Modifiye edilmiş ve kurşun içeren solüsyonda şartlandırılmış elektrodun SEM ile yüzey analizi

*R. arrhizus* ile modifiye edilen ve  $5.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) içeren solüsyonda 15 dk boyunca şartlandırılan elektrotun yüzeyi SEM ile görüntülenmiş ve elementel analizi yapılmıştır. *R. Arrhizus'* a ait partiküllerde biriken kurşun miktarı, elementel analiz sonucunda %30.564 (w/w) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Non-modifiye elektrot yüzeyinde Pb(II) birikimi olmaması (Şekil 4.11a), modifiye elektrot yüzeydeki birikimin *R. arrhizus'* dan kaynaklandığını doğrulamaktadır (Şekil 4.11b).



**Şekil 4.11** Modifiye edilmemiş (a) ve *R. arrhizus* ile modifiye edilmiş (b) elektrot yüzeylerinin SEM görüntüleri

**Çizelge 4.2** Elementel analiz sonuçları

| <b>Komponent</b> | <b>Non modifiye CPE</b> | <b>Modifiye CPE</b> |
|------------------|-------------------------|---------------------|
|                  | <b>Kons. (wt. %)</b>    | <b>Kons. (wt %)</b> |
| Pb(II)           | 0.00                    | 30.564              |
| C                | 72.603                  | 57.117              |
| O                | 27.397                  | 12.319              |

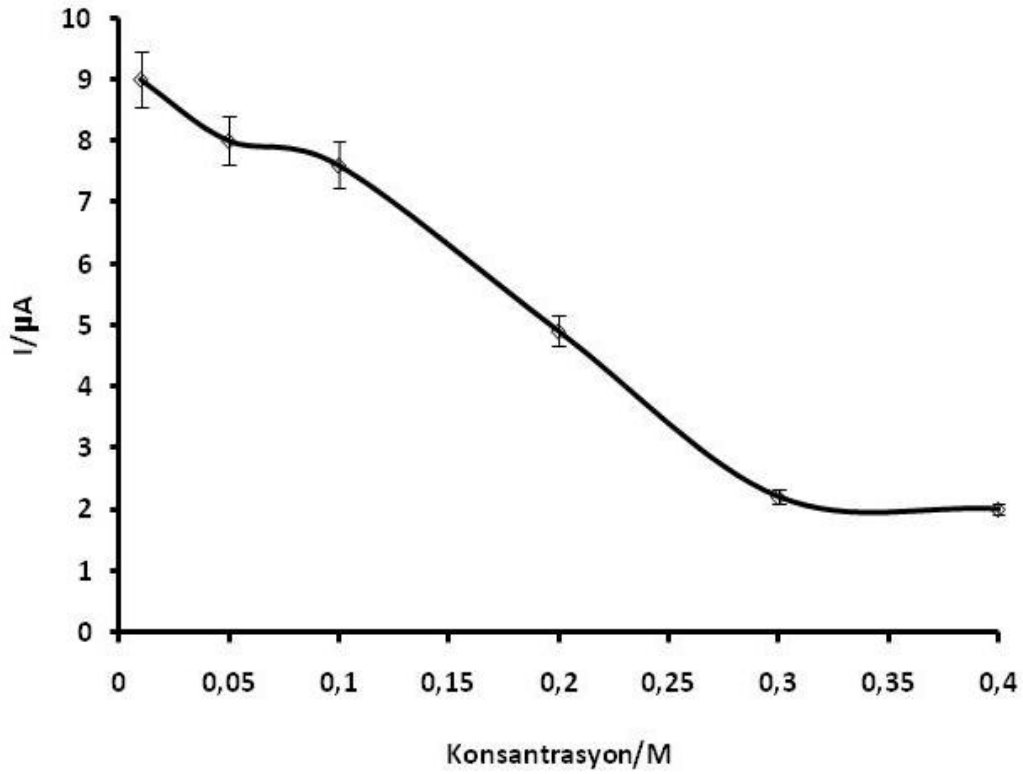
#### **4.2.3. Destek elektrolit çözeltisinin ve iyonik aralığın elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin araştırılması**

En iyi analiz koşullarını sağlamak için arka plan gürültüsü en az olan ve metali en belirgin şekilde tayin eden elektrolit çözeltisini seçmek üzere amonyak ( $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ ), nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ ), asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ ), sodyum nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) ve tris hidroklorik asit (Tris-HCl) çözeltileri, konsantrasyonları 0.05 M olacak şekilde hazırlanarak  $1.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) konsantrasyonu için denenmişlerdir (Çizelge 4.3). En iyi sonuç Tris-HCl kullanıldığında elde edilmiştir.  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$  kullanıldığında herhangi bir pik gözlenmezken,  $\text{NaNO}_3$  kullanıldığında Tris-HCl ile benzer pik akımları gözlenmiştir. Ancak arka plan gürültüsü daha az olduğu için Tris-HCl tamponu en uygun destek çözeltisi olarak seçilmiş ve sonraki çalışmalarda da kullanılmıştır.

Seçilen destek elektrolit çözeltisi konsantrasyonunun elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. 0.01 ile 0.5 M iyonik aralıklarda denenilen Tris-HCl en iyi Pb(II) piklerini en düşük iyonik aralıkta vermiştir (0.01 M), artan iyonik aralık değerleri elektrokimyasal cevap üzerinde negatif etki yapmıştır (Şekil 4.12).

**Çizelge 4.3** Farklı elektrolit çözeltilerinin pik akımı üzerindeki etkisi

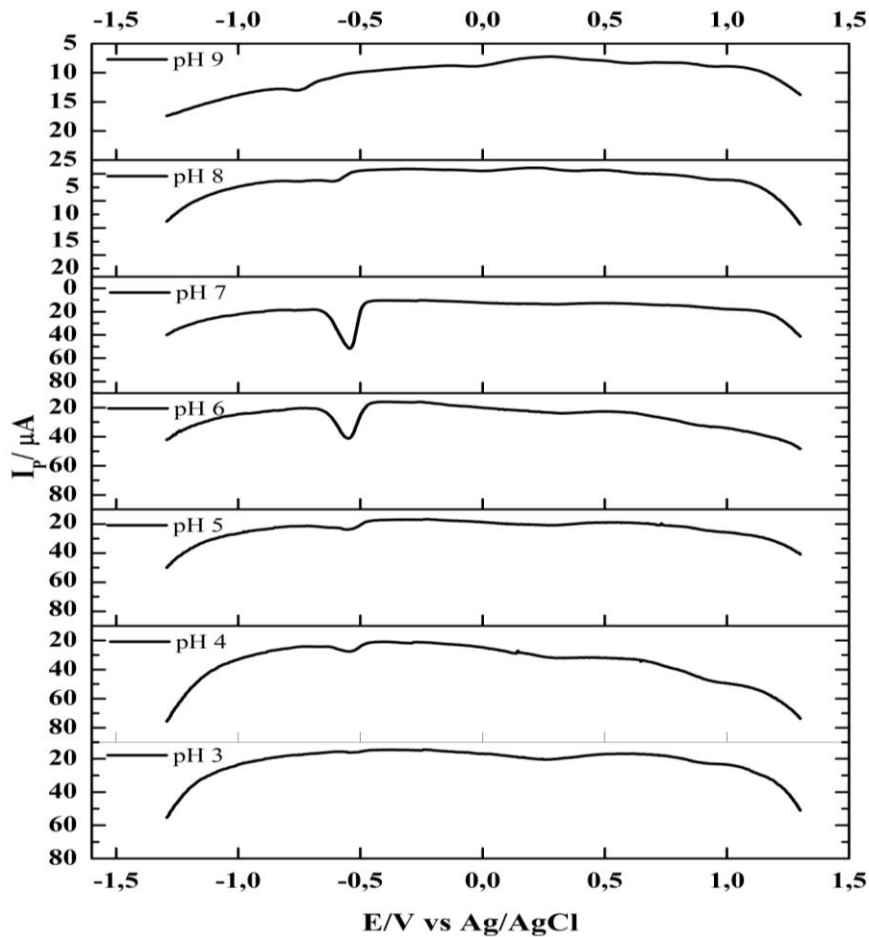
| Destek elektrolit çözeltileri                      | U (V) | I <sub>p</sub> (μA) |
|--|-------|---------------------|
| 0.05 M NH <sub>4</sub> Cl/ NH <sub>3</sub>         | -     | -                   |
| 0.05 M HNO <sub>3</sub>                            | -0.42 | 0.46 ± 0.08         |
| 0.05 M CH <sub>3</sub> COONa/ CH <sub>3</sub> COOH | -0.56 | 1.28 ± 0.03         |
| 0.05 M NaNO <sub>3</sub>                           | -0.71 | 4.73 ± 0.20         |
| 0.05 M Tris HCl                                    | -0.56 | 6.10 ± 0.06         |



**Şekil 4.12** İyonik aralığın elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

#### 4.2.4.Şartlandırma çözeltisi pH' sının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi

Şartlandırma çözeltisinin pH' sı solüsyondaki metal iyonlarının çözünürlüğünü ve hücre duvarındaki fonksiyonel grupların iyonizasyon durumunu etkilediği için önem taşır (Gardea-Torresdey et al., 1999). Şartlandırma çözeltisi pH' sının geliştirilen mikrobiyal sensörün elektrokimyasal cevabı üzerindeki etkisini araştırmak üzere  $1.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) içeren solüsyonlarda pH 3.0-9.0 aralığında yapılan çalışmalarda pH 7.0' e kadar pik akımları artmış bu değerden sonra düşüş göstermiş ve pH 9.0 da ilgili pik tamamen kaybolmuştur (Şekil 4.13). Optimum pH 7.0 olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda bu değer kullanılmıştır.

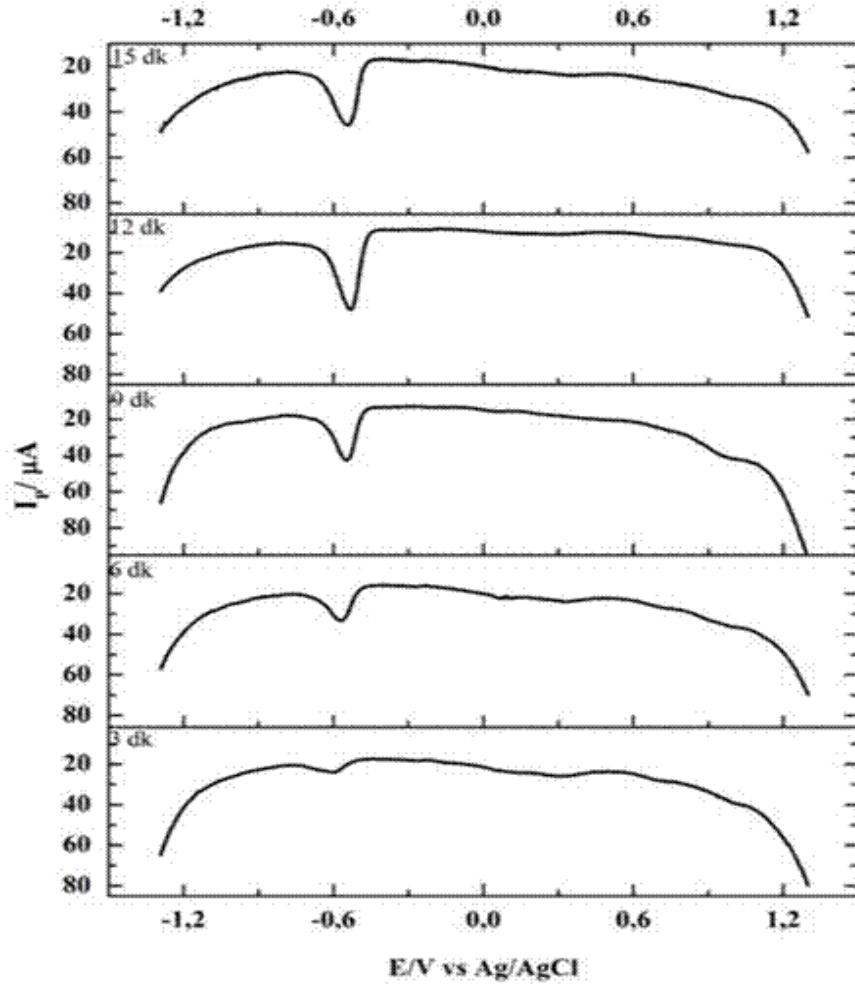


Şekil 4.13 Şartlandırma çözeltisinin pH' sının elektrokimyasal cevap üzerine etkisi



#### 4.2.5. Şartlandırma zamanının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi

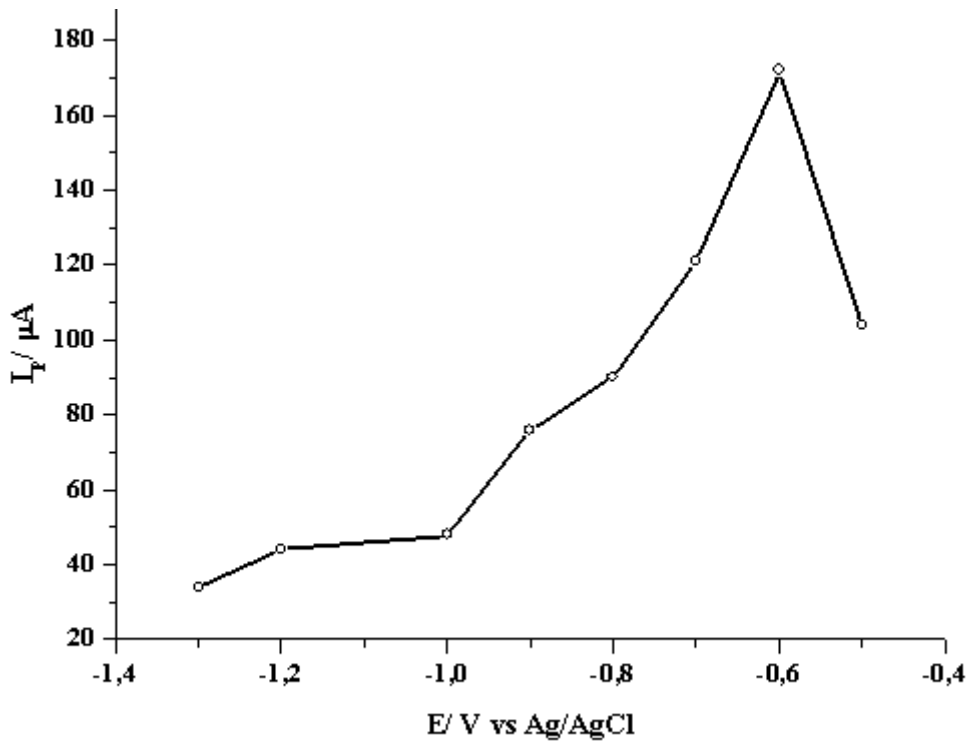
Şartlandırma zamanı yüzeye adsorblanan metal miktarı ile doğrudan ilgilidir ve optimum tayin koşullarının belirlenmesi açısından önem taşır. Şartlandırma süresinin elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisi  $1.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) içeren solüsyonda 3.0-15 dk aralığında denenmiş ve en belirgin Pb(II) pikleri 12 dk'lık sürede elde edilmiştir. Bu süreden daha kısa şartlandırmada Şekil 4.14' de görüldüğü gibi Pb(II)'a ait pikler net bir şekilde gözlenmemiştir. Daha uzun sürelerdeki şartlandırmalarda ise pik akımlarında önemli bir değişiklik gözlenmediği için elektrot yüzeyindeki bağlanma bölgelerinin doygunluğa ulaştığı varsayılmıştır.



Şekil 4.14 Şartlandırma zamanının elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

#### 4.2.6. Depozisyon/Çöktürme potansiyelinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin araştırılması

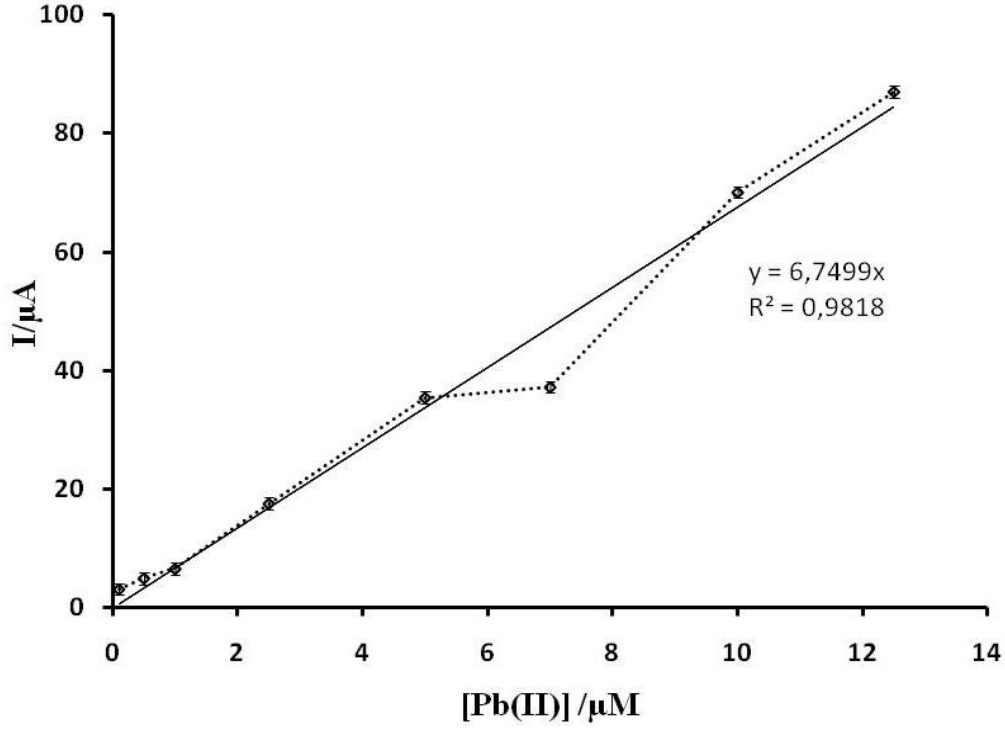
Çöktürme potansiyeli elektrot yüzeyine birikmiş metal iyonlarının çökmesi veya redüklenmesi ile yakından ilgilidir. En fazla miktarda Pb(II)'un yüzeyden ayrılmasını sağlamak veya başka bir deyişle en iyi elektrokimyasal sonuca ulaşmak üzere -1.3 ile -0.4 V aralığında yapılan çalışmalarda, en iyi sonuca -0.6 V potansiyel uygulandığında ulaşılmıştır.



Şekil 4.15 Çöktürme potansiyelinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

#### 4.2.7. Geliştirilen model sensöre ait kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi

Geliştirilen mikrobiyal sensöre ait optimum koşullarda elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.16' da verilmiştir (0.01 M Tris-HCl, pH: 7.0, Şartlandırma süresi: 12 dk, depozisyon potansiyeli: 0.6 V, yöntem: DPSV).

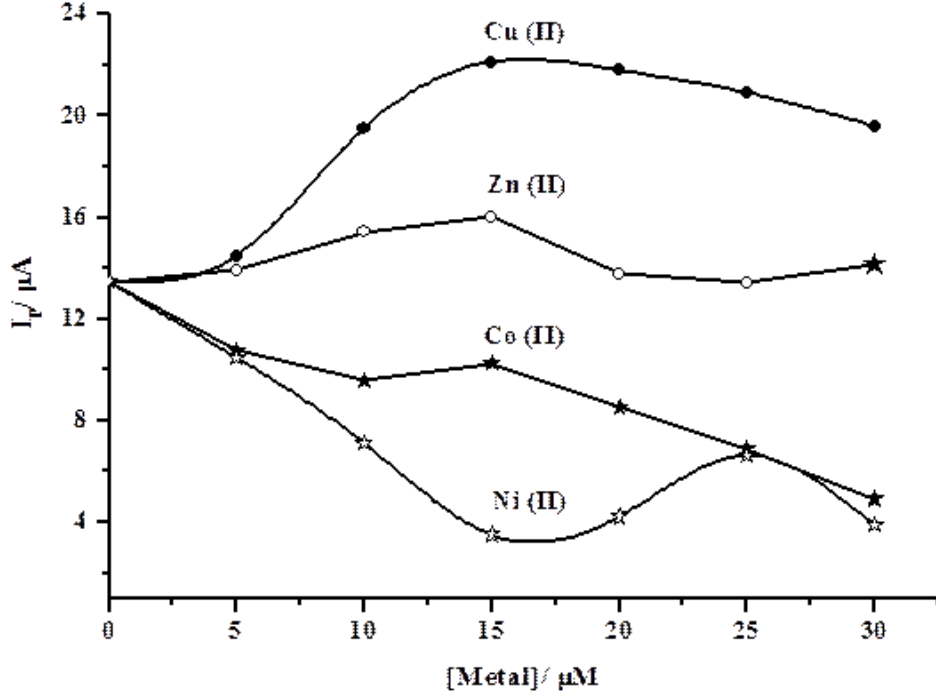


Şekil 4.16 Optimum şartlarda elde edilmiş kalibrasyon doğrusu

Pb(II) konsantrasyonu  $1.0 \times 10^{-7}$ - $1.25 \times 10^{-5}$  M aralığında çalışılmış ( $0.02$ - $2.5$  mg  $L^{-1}$ ) ( $R^2$ :  $0.982$ ), geliştirilen mikrobiyal biyosensörün yaklaşık  $13$   $\mu\text{M}$ 'lık Pb(II) konsantrasyonuna kadar akımla doğrusal bir eğri verdiği görülmüştür. Artan Pb(II) konsantrasyonlarında ise elde edilen akım değerleri doğrusallıktan sapma göstermiştir. İlgili mikrobiyal biyosensöre ait tayin limiti ise  $3S_b/m$  formülü kullanılarak  $1.3 \times 10^{-8}$  M olarak hesaplanmıştır (Akyılmaz et al., 2010).

#### 4.2.8.Farklı ağır metallerin Pb(II) kurşun tayini üzerindeki girişim etkilerinin araştırılması

Ortamda bulunan diğer metaller analitin yüzeydeki fonksiyonel gruplara bağlanmasını olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilirler. Bu nedenle sabit miktarda ( $2.5 \times 10^{-6}$  M) Pb(II) içeren solüsyonlara kademeli olarak artan miktarlarda ( $2.5 \times 10^{-6}$  M-  $3.0 \times 10^{-5}$  M) Ni(II), Co(II), Zn(II) ve Cu(II) iyonları eklenerek, bu metallerin Pb(II) tayini üzerinde nasıl bir etki oluşturdukları araştırılmıştır (Şekil 4.17).

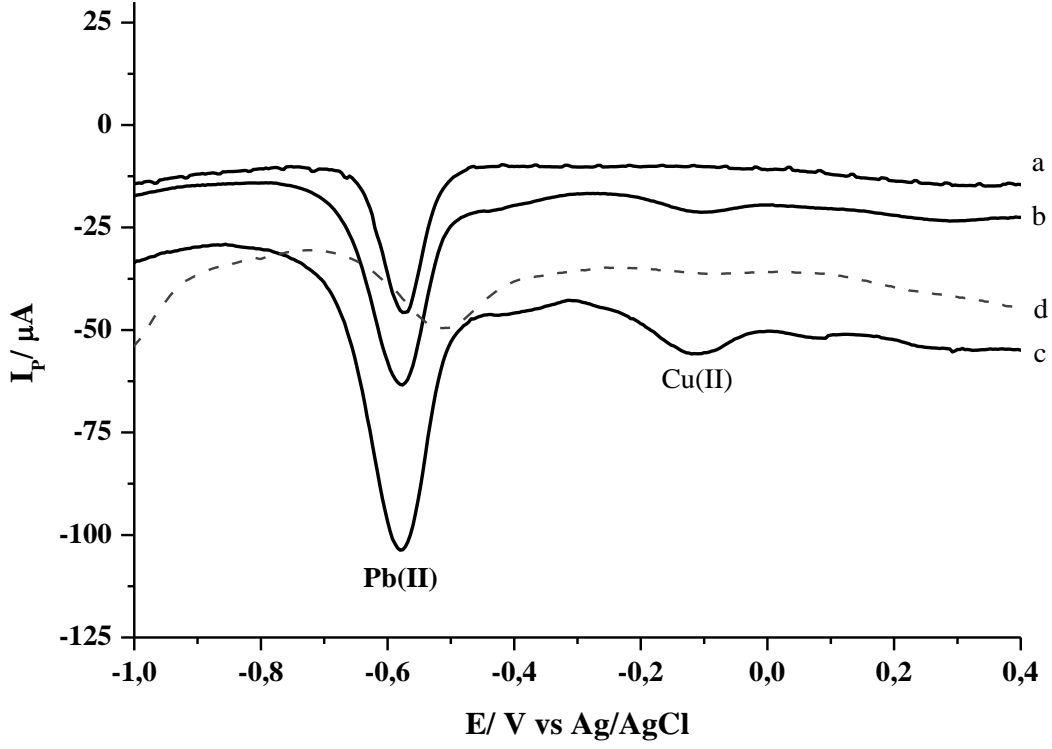


Şekil 4.17 Farklı metallerin Pb(II) cevabı üzerine tekli etkileri

Elde edilen sonuçlara göre Cu(II) ve Zn(II) Pb(II) 'un yüzeye bağlanması üzerinde düşük bir pozitif etki göstermiştir. Bununla birlikte Cu(II), artan konsantrasyonlarında yüzeye bağlanmış ve düşük akımlarla izlenebilen pikler vermiştir. Ni(II) ve Co(II) ise Pb(II) tayini üzerinde negatif bir etki yapmış ve tayin sırasında Pb(II)' a ait pik akımlarını düşürmüştür.

Bu şekilde girişim yapabilecek metallerin ayrı ayrı etkileri araştırıldıktan sonra, bu metallerin ortamda aynı anda bulunduğu model şartlandırma solüsyonları hazırlanarak birlikte etkileri araştırılmıştır (Şekil 4.18). Şekildeki a solüsyonu  $5.0 \times 10^{-6}$  M Pb(II), b solüsyonu  $5.0 \times 10^{-6}$  M Pb(II) ve  $5.0 \times 10^{-6}$  M diğer metalleri, c solüsyonu  $5.0 \times 10^{-6}$  M Pb(II) ve  $10 \times 10^{-6}$  M diğer metalleri, d solüsyonu ise  $5.0 \times 10^{-6}$  M Pb(II) ve  $20 \times 10^{-6}$  M diğer metalleri içermektedir. Görüldüğü gibi ortamda tüm metallerin eşit konsantrasyonda bulunması durumunda (b) veya diğer metallerin konsantrasyonlarının kurşun konsantrasyonunun iki katına çıkması durumunda (c), Pb(II)' e ait pik yüksekliği giderek artmışken bu metallerin daha yüksek konsantrasyonlarında (d) girişim etkisi arttığı için metaller yüzeydeki fonksiyonel gruplara bağlanmak üzere birbirleriyle yarışa girerek Pb(II)'e ait tayin seçiciliğini düşürmüşlerdir. Pb(II)' e ait pik yüksekliği, diğer metallerin

çok yüksek konsantrasyonlarda azalma göstermiş olmasına rağmen voltamogramlarda oldukça belirgin bir biçimde izlenmeye devam etmiştir. Uygulanan yöntemle Cu(II)'in yüksek konsantrasyonlarında verdiği düşük akımlı pik dışında diğer metallere ait herhangi bir cevap tespit edilmemiştir.



Şekil 4.18 Farklı metallerin Pb(II) cevabı üzerine birlikte etkileri

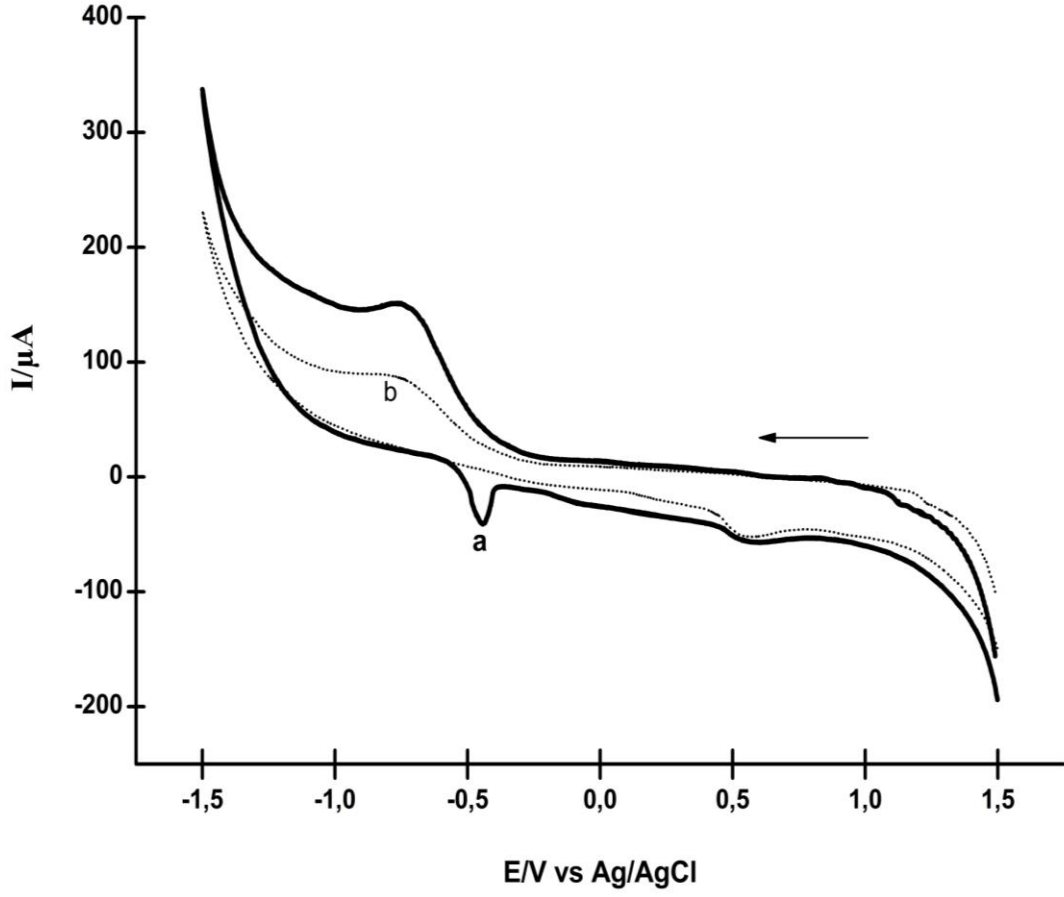
### **4.3. *P. aeruginosa* Kullanılarak Geliştirilen Mikrobiyal Biyosensör için Araştırma Bulguları**

Sıcaklıkla kurutulmuş *P.aeruginosa* hücreleri kullanılarak geliştirilen Pb(II) seçici mikrobiyal sensörün optimum tayin koşulları aşağıda sunulduğu gibi detaylarıyla araştırılmıştır.

#### **4.3.1. CPE kullanılarak Pb(II) içeren şartlandırma ortamlarında dönüşümlü voltametri çalışmalarının gerçekleştirilmesi**

Dönüşümlü voltametri çalışmaları  $1.0 \times 10^{-4}$  M Pb(II) içeren 20 ml, 0.05 M sodyum asetat tampon solüsyonunda gerçekleştirilmiştir. Biyolojik materyal içermeyen elektrotlar, biyolojik materyal içeren elektrotlarla eşit şartlarda analiz edilmiş ve kontrol olarak kullanılmıştır.

*P. aeruginosa* ile modifiye edilen elektrotların voltamogramlarında -0.6 ve -0.4 V aralığında kurşuna ait pik belirgin bir şekilde gözlenirken (Şekil 1a), biyolojik materyal içermeyen karbon pastası elektrotlarında izlenebilir bir pike rastlanmamıştır (Şekil 4.19). Elde edilen sonuçlar voltamogramlarda görülen pikin kullanılan biyolojik materyalden kaynaklandığına işaret etmektedir. İlgili potansiyel aralığının kurşuna ait olduğu literatürde farklı çalışmalarda da gösterilmiştir.

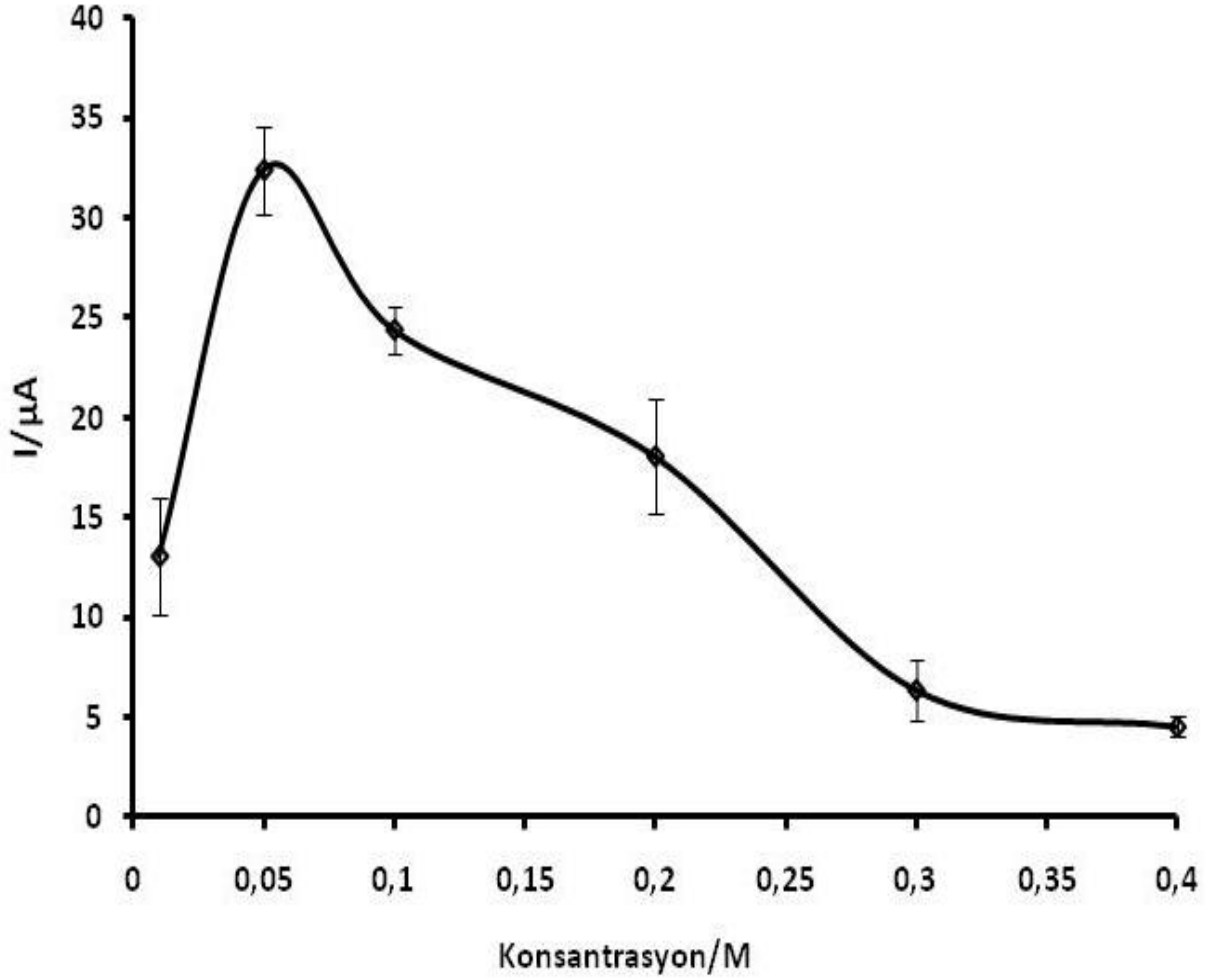


**Şekil 4.19** Modifiye edilmiş (a) ve edilmemiş (b) CPE elektrotlarının dönüşümlü voltamogramları (Pb(II) konsantrasyonu:  $1.0 \times 10^{-4}$  M, ölçüm çözeltisi: 0.05 M sodyum asetat tamponu, tarama hızı: 80 mV/sn, şartlandırma zamanı: 15 dk, yöntem: DPSV)

#### 4.3.2. Destek elektrolit çözeltisinin ve iyonik aralığın elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin araştırılması

En iyi analiz koşullarını sağlamak üzere arka plan gürültüsü en az olan ve metali en belirgin şekilde tayin eden elektrolit çözeltisini seçmek üzere; sodyum nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), Tris-HCl, amonyak ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ve asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) çözeltileri, konsantrasyonları 0.05 M olacak şekilde hazırlanarak  $1.0 \times 10^{-4}$  M Pb(II) için denenmişlerdir. Denenen tüm çözeltiler arasında, sadece sodyum asetat tamponu ile istenilen sonuca ulaşılmıştır.

Seçilen destek elektrolit çözeltisi konsantrasyonunun elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 0.3 ve 0.4 M iyonik aralıklarında  $2.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) konsantrasyonu için denenen asetat tamponu en iyi Pb(II) piklerini 0.05 M konsantrasyonda vermiştir (Şekil 4.20). Artan iyonik güç elektrokimyasal cevap üzerinde negatif etki yapmıştır.

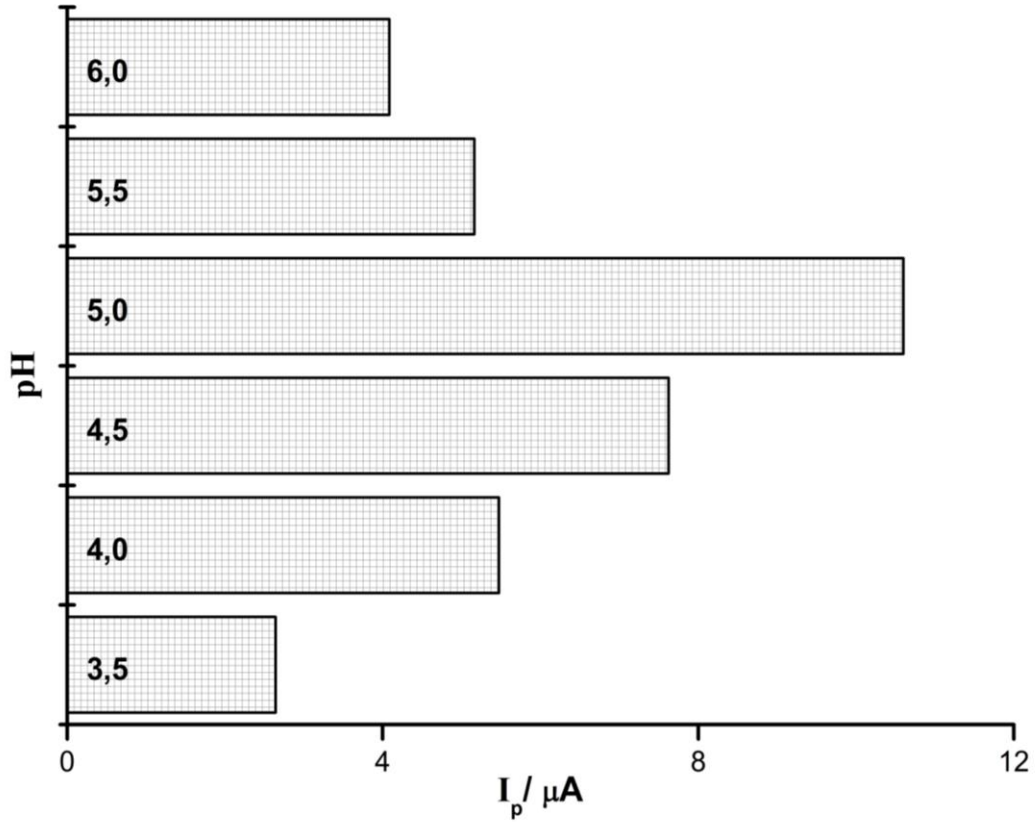


Şekil 4.20 İyonik aralığın elektrokimyasal cevap üzerine etkisi



### 4.3.3.Şartlandırma çözeltisi pH' sının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi

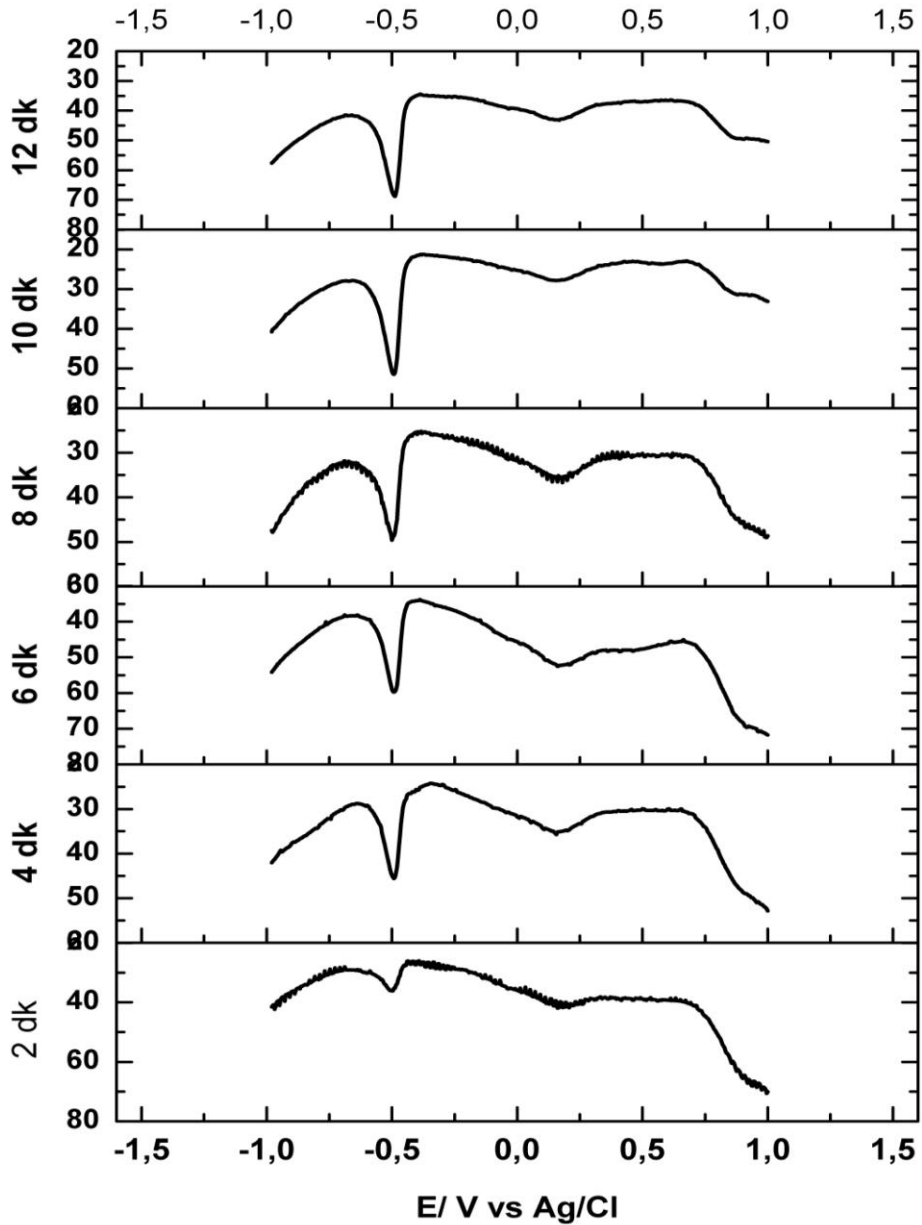
Şartlandırma çözeltisinin pH' sı solüsyondaki metal iyonlarının çözünürlüğünü ve hücre duvarındaki fonksiyonel grupların iyonizasyon durumunu etkilediği için önem taşır. Şartlandırma çözeltisi pH' sının geliştirilen mikrobiyal sensörün elektrokimyasal cevabı üzerindeki etkisini araştırmak üzere  $1.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) içeren solüsyonlarda pH 3.5- 6.0 aralığında yapılan çalışmalarda pH 5.0' e kadar pik akımları artmış bu değerden sonra düşüş göstermiştir (Şekil 4.21). Optimum değer pH 5.0 olarak seçilmiş ve sonraki çalışmalarda bu değer kullanılmıştır.



Şekil 4.21 Şartlandırma çözeltisinin pH' sının elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

#### 4.3.4.Şartlandırma zamanının elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin belirlenmesi

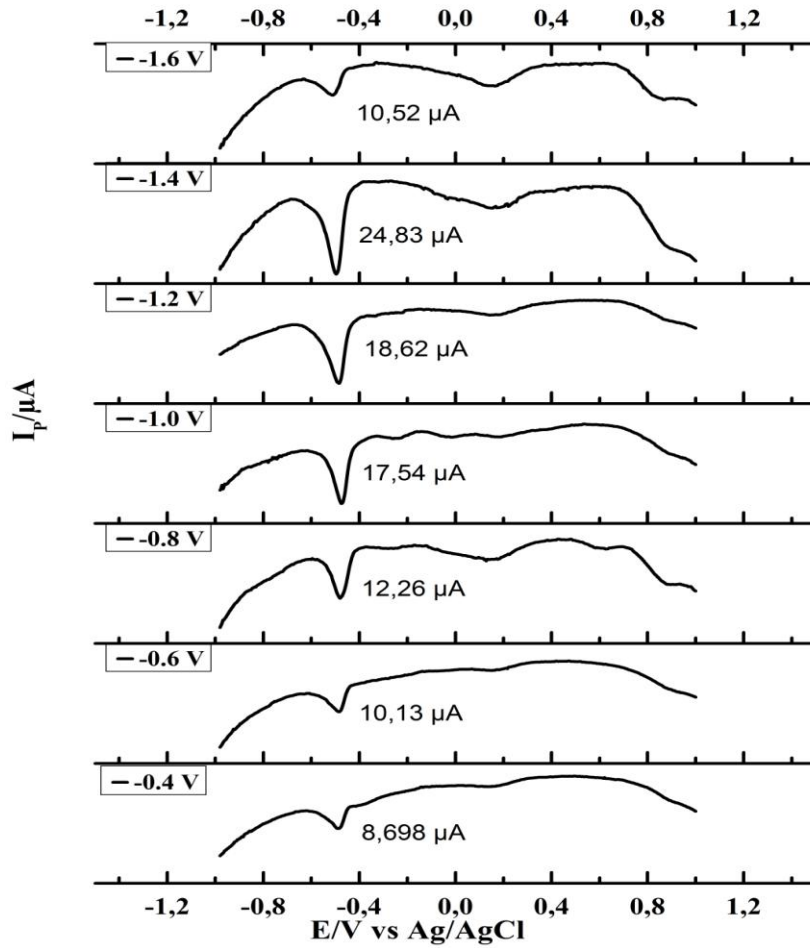
Şartlandırma zamanı yüzeye adsorblanan metal miktarı ile doğrudan ilgilidir ve optimum tayin koşullarının belirlenmesi açısından önem taşır. Şartlandırma süresinin elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisi  $2.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) içeren solüsyonda 2.0- 16 dk aralığında denenmiş ve en iyi Pb(II) pikleri 12 dk' lık sürede elde edilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 Şartlandırma süresinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

#### 4.3.5. Depozisyon/çöktürme potansiyelinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin araştırılması

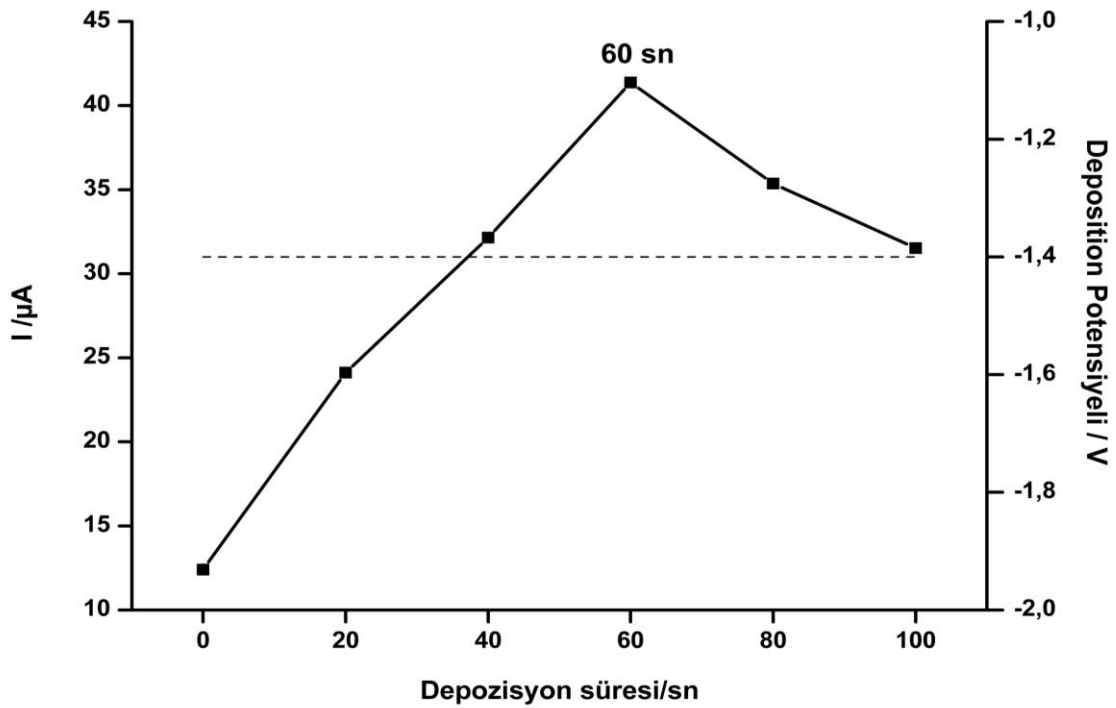
Çöktürme potansiyeli elektrot yüzeyine birikmiş metal iyonlarının çökmesi veya redüklenmesi ile yakından ilgilidir. En fazla miktarda Pb(II)'un yüzeyden ayrılmasını sağlamak için -1.6 ve -0.4 V aralıklarında yapılan çalışmalarda, en iyi pik akımına -1.4 V' da ulaşılmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 Depozisyon potansiyelinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

#### 4.3.6. Depozisyon/Çöktürme süresinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisinin araştırılması

Optimum depozisyon süresini belirlemek üzere yapılan çalışmalarda ise sabit -1.4 V depozisyon potansiyeli uygulanarak 0.0- 100 sn aralığında  $2.0 \times 10^{-5}$  M Pb(II) için denemeler yapılmıştır. Şekil 4.24' de görüldüğü gibi en uygun depozisyon süresi 60 sn olarak belirlenmiştir.



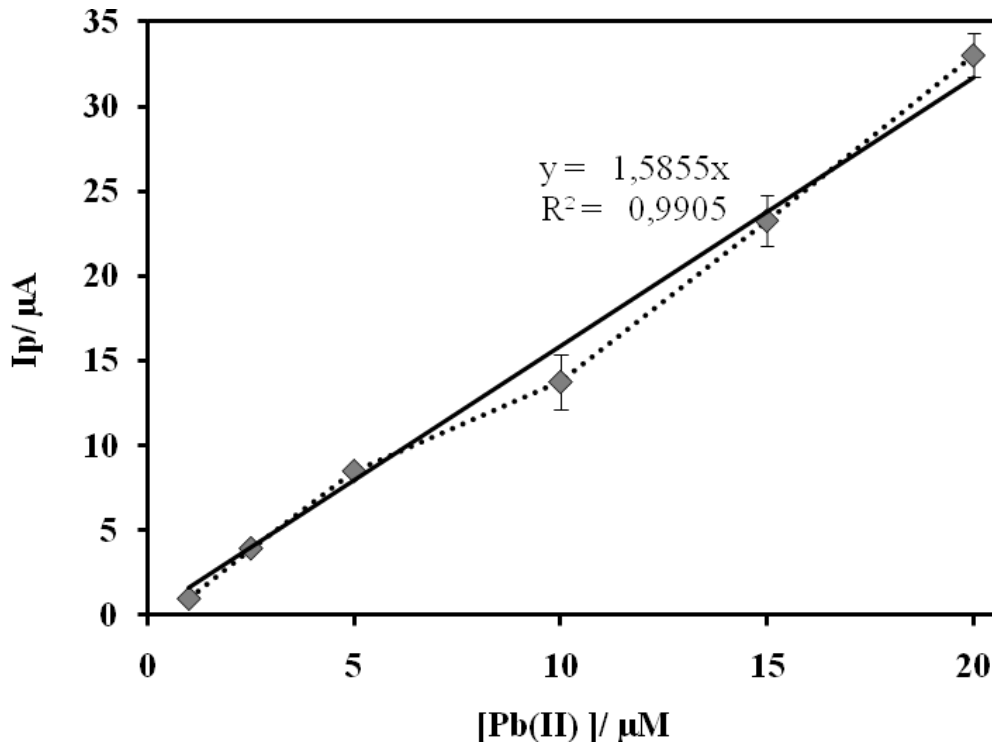
Şekil 4.24 Depozisyon süresinin elektrokimyasal cevap üzerine etkisi

#### 4.3.7. Geliştirilen model sensöre ait kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi

Geliştirilen mikrobiyal sensöre ait optimum koşullarda elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.25' de verilmiştir (Elektrolit çözeltisi: 0.05 M sodyum asetat tamponu, pH: 5.0,

şartlandırma süresi: 12 dk, depozisyon potansiyeli: -1.4 V, depozisyon süresi: 60 sn, yöntem: DPSV).

Pb(II) konsantrasyonu  $1.0 \times 10^{-6}$  M ile  $2.0 \times 10^{-5}$  M aralığında çalışılmış ( $n=2$ ,  $R^2=0.9916$ ), geliştirilen mikrobiyal biyosensörün yaklaşık 20  $\mu\text{M}$ 'lık Pb(II) konsantrasyonuna kadar akımla doğrusal bir eğri verdiği görülmüştür. Artan Pb(II) konsantrasyonlarında ise elde edilen akım değerleri doğrusallıktan sapma göstermiştir. İlgili mikrobiyal biyosensöre ait tayin limiti ise  $3S_b/m$  formülü kullanılarak  $2.0 \times 10^{-8}$  M olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.25 Optimum şartlarda elde edilmiş kalibrasyon doğrusu

Geliştirilen mikrobiyal biyosensörün yenilenebilirliği  $1.5 \times 10^{-5}$  M Pb(II) için ( $n=7$ ) test edilmiş ve elde edilen değerlerin ortalaması 25.63  $\mu\text{A}$  ( $SD= 1.06$ ), cv (coefficient of variation) değeri %4 olarak bulunmuştur.

#### 4.3.8.Farklı ağır metallerin Pb(II) tayini üzerindeki girişim etkilerinin araştırılması

Ortamda bulunan diğ er metaller analitin yüzeydeki fonksiyonel gruplara bağ lanmasını olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilirler. Bu nedenle girişim yapabilecek bazı metallerin etkileri teker teker ve toplu olarak araştırılmış ve özet şeklinde Çizelge 4.4' de sunulmuştur.

**Çizelge 4.4** Farklı ağır metallerin kurş un tayini üzerindeki girişim etkilerinin araştırılması

| <b>Metaller</b>                               | <b>[Metal] /<math>\mu</math>M</b> | <b><math>I_p</math> /<math>\mu</math>A</b> | <b>%Aktivite</b> |
|---|-----------------------------------|--|------------------|
| Pb(II)  | 10                                | $12,59 \pm 0,02$                           | 100              |
| Co(II)  | 10                                | 0  | 0                |
| Pb(II) + Co(II)                               | 10+10                             | $13,70 \pm 0,29$                           | 109              |
| Cu(II)  | 10                                | 0  | 0                |
| Pb(II) + Cu(II)                               | 10+10                             | $8,91 \pm 0,14$                            | 71               |
| Ni(II)  | 10                                | 0  | 0                |
| Pb(II) + Ni(II)                               | 10+10                             | $3,20 \pm 0,09$                            | 25               |
| Zn(II)  | 10                                | 0  | 0                |
| Pb(II) + Zn(II)                               | 10+10                             | $18,62 \pm 1,48$                           | 148              |
| Pb(II) + Zn(II) + Cu(II) +<br>Co(II) + Ni(II) | 10+10+10+10+10                    | $7,44 \pm 0,04$                            | 59               |
| Pb(II) + Zn(II) + Cu(II) +<br>Co(II) + Ni(II) | 10+30+30+30+30                    | $2,71 \pm 0,41$                            | 22               |

## 5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyolojik sistemlerin yüksek hassasiyetleri ve kimyasal ajanlara kıyasla düşük maliyetleri sensör yapımında biyolojik materyal kullanımına olan ilgiyi arttırmıştır. Çevresel kirleticilerin hızlı, güvenilir bir şekilde ve yerinde tayin edilmesi konusunda yapılan çalışmalarda biyosensörler en fazla odaklanılan konulardan biri haline gelmiştir. Bugüne kadar yapılan birçok araştırma mikroorganizmaların özellikle ağır metal kirliliğinin giderilmesinde başarılı bir şekilde kullanıldığını göstermiştir. Özellikle atık sulardaki kimyasal kirleticilerin biyolojik olarak arıtılması konusunda yoğunlaşan çalışmalarda, farklı türlerden mikroorganizmaların, toksik olduğu bilinen ağır metal çeşitlerini gerek biyosorbsiyon gerekse biyobirikim yoluyla zararsız veya daha az toksik formlarına dönüştürebildikleri, hücre duvarlarındaki fonksiyonel gruplarla veya salgılarıyla tutabildikleri, hücre içi sistemleriyle biriktirebildikleri ortaya konulmuştur. Ancak ağır metallerle özel olarak etkileşim gösteren bu mikroorganizmaların, genetik olarak herhangi bir modifikasyona uğratılmadan doğrudan olarak mikrobiyal biyosensör tasarımında kullanılmak üzere elektrokimyasal davranışlarının belirlenmesi konusunda literatürde az sayıda çalışma mevcuttur ve yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu kimyasal bazlı sensör üretimlerine dayanmaktadır. Ancak mikroorganizmaların doğrudan seçici madde olarak kullanımları, kimyasal ajanlara kıyasla daha düşük maliyetlidir.

Sunulan tez çalışmasında, *R. mucilaginosa*, *R. arrhizus* ve *P. aeruginosa* türleri ağır metal tayinindeki spesifik etkinlikleri ortaya çıkarılmak üzere, geleneksel yöntemlere nazaran daha hızlı ve pratik olan elektrokimyasal yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların, ağır metaller içinde özellikle kurşuna ve bakıra karşı spesifik bağlanma yeteneklerinin olduğu daha önceden yapılan biyosorbsiyon çalışmalarında ortaya çıkarılmıştır (Sağ ve Kutsal, 1997; Ertuğrul vd. 2009). Literatürde bu yönde yapılan çalışmalar; canlı hücrelerden ziyade kurutulmuş-ölü hücrelerin metali adsorblama yeteneklerinin daha güçlü olduğuna işaret etmektedir. Ölü veya canlı hücrelerin metal alabilme kapasitelerinin karşılaştırılması sonucu, çoğu kez ölü durumdaki mikroorganizmanın daha yüksek adsorplama kapasitesine sahip olduğu gözlenmiş ve buna gerekçe olarak ölü hücre yüzeyinin yapısındaki değişiklikler ve kurutma/öldürme ile birlikte ortaya çıkan fonksiyonel gruplar gösterilmiştir (Tsezos ve Volesky, 1981; Aksu ve Gülen, 2002). Kurutulmuş hücrelerin biyosensör yapımında kullanılması, hem

mikroorganizma ön hazırlığı aşamasını (örneğin: inkübasyon, santrifüj, canlı hücrelerin optimum şartlarda korunma zorunluluğu) ortadan kaldırmaktadır hem de canlı hücrelere kıyasla çevresel şartlardan daha az etkilenmeleri sebebiyle ortam şartlarından bağımsız güvenilir analizler gerçekleştirme olanağını sunmaktadır. Bahsedilen avantajlı özellikleri nedeni ile ilgili tez çalışmasında canlı hücreler yerine sıcaklıkla veya dondurularak kurutulmuş mikrobiyal hücreler kullanılmıştır. Diğer taraftan, uygulanan elektrokimyasal yöntemler literatürde uzun zamandan beri kullanılagelen geleneksel yöntemler olmalarına karşın, ağır metal biyosorbsiyonunda etkin olan mikrobiyal türlerin ağır metal biyosensörü yapımında kullanılmak üzere bu yöntemlerle araştırılması fikri, ilgili tez çalışmasında ortaya çıkan ve ulaşılan sonuçlar itibariyle ticari üretime yakın bir fikirdir.

İlgili tez çalışmasından elde edilen sonuçlar bir bütün olarak karşılaştırıldığında görülmektedir ki mikroorganizmalar kullanılarak geliştirilen ağır metal sensörleri, kimyasal ajanlarla veya diğer biyolojik ajanlarla hazırlanmış ağır metal sensörlerine bir alternatif olmaktan ziyade, kullanım kolaylıkları, düşük maliyetleri ve kısa ölçüm süreleri gibi avantajları dolayısıyla üstünlük sağlayabilecek bir potansiyel sergilemişlerdir.

*R. mucilaginosa* hücrelerinin dondurularak kurutulmuş formlarının kullanıldığı çalışmada, içerisinde belli konsantrasyonlarda Cu(II) içeren model solüsyonlarla elektrokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiş ve ilgili hücrelerin şartlandırma aşamasını da içeren 15 dk'lık bir sürede Cu(II) iyonlarını tespit edebildiği görülmüştür. Literatürde ilgili mikroorganizmanın herhangi bir şekilde sensör elementi olarak kullanıldığına dair bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte, mikroorganizmanın Cu(II) biyosorbsiyon çalışmalarında etkin bir şekilde rol aldığı bildirilmiştir (Villegas vd. 2005; Mamieieva vd. 2007, Villegas vd. 2009). İlgili mikroorganizmanın kullanıldığı tez çalışmasını da içeren, literatürdeki bazı Cu(II) sensörlerinin özellikleri Çizelge 5.1' de verilmiştir.

Tablodan görüldüğü üzere farklı kimyasal ve biyolojik materyaller farklı analiz yöntemleri ile Cu(II) tespiti için kullanılmış ve sonuçlar, ölçüm süreleri ve tayin aralıkları açısından karşılaştırılmıştır. Kullanılan elektrot çeşitleri arasında karbon pastası elektrodu, hazırlanmasının kolay ve ucuz olması, herhangi bir tutuklama yöntemine gerek duymadan seçici materyali yüzeyinde tutabilmesi gibi pratik özellikleri nedeni ile avantajlı bir konumdadır. Seçici materyal olarak kimyasal madde yerine, kısa zamanda ve bol miktarda



üretimleri oldukça basit ve ucuz olan bazı biyolojik ajanların tercih edilmesi ise sensörün yapım aşamasındaki maliyetini düşürmektedir.

**Çizelge 5.1** Literatürdeki bazı Cu(II) analitik ve teknik özellikleri

| Materyal                                    | Elektrot   | Yöntem                | Süre   | Ölçüm Aralığı                                    | Ref.              |
|---|--|-----------------------|--------|--|-------------------|
| Rekombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Hücrelerin kapiler membran üzerine tutuklanması      | Flow Injection Analiz | >30 dk | 0.05-0.35 mg/L                                   | Tag vd. 2007      |
| Rekombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Hücrelerin kapiler membran üzerine tutuklanması      | Amperometrik tayin    | >20 dk | $5.0 \times 10^{-4}$ -<br>$2.0 \times 10^{-3}$ M | Lehmann vd. 2000  |
| <i>Circinella sp.</i>                       | Cansız hücrelerin karbon pastasına karıştırılması    | Stripping Voltammetri | 30 dk  | $5.0 \times 10^{-7}$ -<br>$1.0 \times 10^{-5}$ M | Alpat vd. 2008    |
| $\alpha$ -Benzoinoxime                      | Kimyasalın XAD-2 üzerine tutuklanması                | Gravimetrik Tayin     | 4 dk   | 5.0-<br>127 mg/L                                 | Mahendra vd. 2003 |
| Schiff bazı                                 | Schiff bazının polivinil klorid üzerine tutuklanması | Optik tayin           | 2.5 dk | $1.0 \times 10^{-8}$ -<br>$5.7 \times 10^{-4}$ M | Aksuner vd. 2009  |
| Doğal zeolit                                | Cansız hücrelerin karbon pastasına karıştırılması    | Sıyırma Voltammetri   | 15 dk  | $5.0 \times 10^{-8}$ -<br>$5.0 \times 10^{-6}$ M | Alpat vd. 2005    |
| Liyofilize <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>  | Cansız hücrelerin karbon pastasına karıştırılması    | Sıyırma Voltammetri   | 15 dk  | $1.0 \times 10^{-7}$ -<br>$1.0 \times 10^{-5}$ M | <b>Tez</b>        |

Kullanılan seçici biyolojik materyali herhangi bir genetik düzenlemeye ihtiyaç duymadan olduğu gibi kullanabilmek; işlem ön hazırlığını kolaylaştırması ve sensörün maliyeti bakımından önem teşkil etmektedir. Bu bilgiler ışığında Çizelge 5.1' deki veriler karşılaştırıldığında *R.mucilaginosa* kullanılarak kısa sürede, fazla bir örnek hazırlığına

ihtiyaç duymadan model solüsyonlardaki Cu(II) miktarını belli konsantrasyon aralıklarında ölçmenin mümkün olduğu görülmüştür.

Farklı hücrelerin hücre duvar yapıları itibariyle sahip oldukları farklı fonksiyonel gruplar ve bu grupların yoğunluğu hücrelerin metal bağlama kapasiteleri üzerinde oldukça etkilidir ve ayrıntılı bir şekilde araştırılmaları analit spesifik sensörlerin tasarımı açısından önem arz etmektedir.

*R. arrhizus* çalışmalarında *P. aeruginosa* 'dan daha spesifik bir şekilde ve çok daha düşük tayin limitleriyle Pb(II)'a cevap alınmış, elektrokimyasal verilerden alınan aletsel sinyal/gürültü düzeyleri yine *P. aeruginosa* 'ya kıyasla daha düşük bulunmuştur. *R. arrhizus* spor oluşturan bir küf mantarı türüdür. Bakteri hücre duvarından farklı olarak, fungal hücre duvarı protein içeriği bakımından zayıftır. Mantar hücre duvarları, kuru ağırlığının %90'ı amino polisakkaritlerden oluşan çok tabakalı bir yapı gösterir. Genelde fungal hücre duvarı, amorf polisakkarit bir matriks içine gömülmüş kitin iskeletinden oluşan iki fazlı bir sistemdir. Esas kitin monomeri N-asetil-D-glukozamin (NAGA) dir. Kitin mikrokristaller içinde toplanarak hücre duvarının gelişmesi için iskeletimsi bir kafes oluşturur. Kitinin metal iyonlarıyla kompleks oluşturması bilinen bir özelliktir. Çözünmüş metal iyonlarıyla *R. arrhizus* hücre duvarları arasındaki kitin zincirleri arasında kompleks oluşmaktadır. Metal iyonu bu kompleksde kitin kristallerinin amino azotuna bağlanmaktadır (Tsezos and Volesky, 1981).

Elektrokimyasal yanıtları optimize etmek üzere farklı elektrolit çözeltilerinin denendiği çalışmada, *P. aeruginosa* hücreleri sadece asetik asit sodyum asetat tamponu kullanıldığında Pb(II)'a cevap vermiş, diğer çözeltilerde ise Pb(II) 'a ait elektrokimyasal bir iz rastlanmamıştır. Ancak sodyum asetat asetik asit çözeltisi metallerle ve özellikle Pb(II) ile kompleksleşme reaksiyonu verebildiği için, şartlandırma süresince solüsyonda bulunan Pb(II) iyonlarının bir kısmının bu çökme dolayısıyla yüzeye tutunamadığını ve bunun da elektrokimyasal cevabın zayıf kalmasında etkin olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yoğun asetik asit sodyum asetat çözeltisi içinde bulunan diğer protonların da yüzeye bağlanmak üzere Pb(II) iyonları ile bir rekabete girmeleri de düşük akımlı elektrokimyasal cevapların bir başka nedeni olabilir. Bu sonuçlar kullanılan destek elektrolit çözelti türlerinin elektrokimyasal analiz sürecindeki önemli etkisine işaret etmektedir.

Belirli bir mikroorganizma türünün, belirli bir metal iyonunu adsorplama kapasitesi, ortamda başka bir metal varken, tek bileşenli duruma göre artabilir (synergism), azalabilir (antagonism) veya hiçbir değişim göstermez (noninteraction). Metal alımının farklı olması, metallerin iyonik boyutları, doğal yapıları, aktif grupların biyosorbent üzerindeki dağılımı ve metal iyonları ile biyosorbent arasındaki etkileşim ile ilgilidir.

Girişim etkileri ortaya çıkarmak üzere, şartlandırma ortamında başka metallerin de bulunduğu solüsyonlarla (Cu(II), Ni(II), Co(II), Zn(II)) yapılan çalışmalar sonucu Pb(II) adsorbsiyonunun en çok Ni(II) tarafından inhibe edildiği ve bunu Cu(II)'nin takip ettiği görülmektedir. Zn(II)'nin ise Pb(II) adsorbsiyonunda sinerjistik veya nötr bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Metallerin iyonik çapları ve elektronegatiflik özelliklerinin de adsorbsiyonda önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bağ yapımında kullanılan elektronların bağı oluşturan atomlar tarafından çekilme gücü elektronegativite olarak adlandırılır. Bağ yapımında kullanılan elektronları daha çok çeken atomun elektronegatifliği büyük, az çekenin ise elektronegatifliği küçüktür. Elektronegatiflik değeri yüksek olan metallerin bağ yapma eğilimleri yüksek olduğundan yüzeye adsorblanmaları diğer daha düşük elektronegativite seviyesindeki metallerden daha kolay ve hızlıdır. İlgili tez çalışmasında kullanılan ağır metaller elektronegatifliklerine ve iyonik çaplarına göre sıralandıklarında aşağıdaki gibi bir tablo görülmektedir (Çizelge 5.2).

**Çizelge 5.2** Bazı metallerin iyonik çapları ve elektronegatiflik değerleri

| <b>Metal</b> | <b>İyonik çap/pm</b> | <b>Elektronegatiflik/Pauling Skala</b> |
|--------------|----------------------|--|
| Pb(II)       | 133                  | 2.33                                   |
| Ni(II)       | 83                   | 1.91                                   |
| Cu(II)       | 88                   | 1.90                                   |
| Co(II)       | 83.8                 | 1.88                                   |
| Zn(II)       | 88                   | 1.65                                   |

(Shannon 1976, <http://www.webelements.com> 2011).

İlgili çizelgeden anlaşıldığı üzere metaller arasında, Pb(II) iyonik çapı en büyük ve elektronegatifliği en yüksek olan metaldir. Dolayısıyla uygun elektrokimyasal şartlar oluşturulduğunda, bu metalin diğer metallerden çok fazla etkilenmeden yüzeye en hızlı ve en çok miktarda bağlanması mikroorganizmaların adsorblayıcı özelliklerinin yanı sıra metalin kendi molekül yapısından da kaynaklanmaktadır.

Çizelge 5.3' de ise bugüne kadar çalışılmış bazı Pb(II) biyosensörleri ile sunulan tez çalışması sonuçlarının, teknik ve analitik açılarından karşılaştırılmasına imkan veren bir özet sunulmuştur. Tablodan anlaşılacağı üzere çalışma sonucu elde edilen tayin sınırları literatürdeki birçok çalışma ile uyum içinde olmakla beraber, kullanım pratikliği ve maliyet açısından bazı önemli avantajlara sahiptir.

**Çizelge 5.3** Literatürdeki bazı Pb(II) sensörlerinin analitik ve teknik özellikleri

| Seçici Materyal                            | Kullanılan Elektrot ve hazırlık                           | Tayin Yöntemi                | Tayin Süresi | Sensör Cevabı                                 | Ref.                   |
|--|---|------------------------------|--------------|---|------------------------|
| Muz Dokusu                                 | Karbon pastası ve muz dokusu karışımı                     | Sıyırma Voltametri           | 6 dk         | 1.0 - 20 ppm                                  | Mojica vd. 2007        |
| <i>Pennisetum setosum</i>                  | İşlenmiş ve İşlenmemiş biyomas ve karbon pastası karışımı | Sıyırma Voltametri           | 5 dk         | 0.02 - 0.08 ppm                               | Bennouna, 1997         |
| Bovin serum albumin                        | Ölü hücre ve karbon pastası karışımı                      | Sıyırma Voltametri           | >2 saat      | $4 \times 10^{-3}$ - $6.0 \times 10^{-5}$ ppm | Yin vd. 2007           |
| HClO <sub>4</sub>                          | İletken maddenin karbon pastası ile karışımı              | Doğrusal Taramalı Voltametri | 15 dk        | 0.1 – 2 ppm                                   | Honeychurch vd. 2001   |
| Portakal kabuğu esansiyel yağı             | Schiff bazının polivinil klorid üzerine tutuklanması      | Sıyırma Voltametri           | 2.5 dk       | 1.0 - 25 ppm                                  | Elvina ve Mojica, 2005 |
| <i>Phormididum</i> sp.                     | Modifiye edilmiş ölü biyomas ve karbon pastası karışımı   | Sıyırma Voltametri           | 10 dk        | 0.01–4 ppm                                    | Yüce vd. 2010          |
| Sıcaklıkla kurutulmuş <i>P. aeruginosa</i> | Sıcaklıkla kurutulmuş hücre ve karbon pastası karışımı    | Sıyırma Voltametri           | 12 dk        | 0.2 – 4 ppm                                   | <i>Tez</i>             |
| Sıcaklıkla kurutulmuş <i>R. arrhizus</i>   | Sıcaklıkla kurutulmuş hücre ve karbon pastası karışımı    | Sıyırma Voltametri           | 12 dk        | 0.02-2.5 ppm                                  | <i>Tez</i>             |

Alınan rakamsal veriler dışında, biyomateryallerin izlenen teknik açısından özgünlüğü, insitü kullanımlara yönelik çalışmalara uygun olması ve düşük maliyetlerle kısa sürede

temin edilebilmesi ilgili çalışmanın pratik anlamda da uygulanabilme potansiyelini ortaya koymaktadır.

Biyosensör teknolojisi temel anlamda multidisipliner bir alt yapıya sahip olduğu için, farklı bilim dallarındaki gelişmelerle beraber hızla ilerlemekte ve kullanım kolaylığı, düşük maliyeti, seri bir şekilde üretilebilmesi gibi önemli avantajları nedeniyle de güçlü bir pazar oluşturmaktadır. Bu bağlamda biyosensör yapımında kritik önemi olan biyolojik materyallerin doğru ve hızlı bir şekilde seçilmeleri ve biyosensör teknolojilerine uyarlanabilir mevcut pazardan faydalanmamız açısından önem taşımaktadır.

Sunulan tez çalışması göstermiştir ki; ağır metal tayinine yönelik böylesi bir yaklaşım bir taraftan mikroorganizmaların ağır metallere karşı spesifik ilgilerini detaylı bir şekilde ortaya çıkarmış diğer taraftan hızlı, ekonomik ve pratik bir şekilde uygulanabilir olması nedeniyle geleneksel yöntemlerle yarış halinde olan biyosensör uygulamalarına hem pratik hem de akademik anlamda farklı bir eksen kazandırmıştır. Elde edilen sonuçların geliştirilmesi ile hızla kirlenen doğanın çevresel kontrolünü sağlama çalışmalarına bir ivme kazandırılması mümkündür.

Bunların dışında elde edilen sonuçların üretime odaklı biyosensör çalışmalarında doğrudan kullanımını hedef alan başka projeler için, ilgili mikroorganizmaların hücre duvar yapılarında bulunan ve ilgili metallere doğrudan etkileşime giren fonksiyonel gruplarının ortaya çıkarılması ve bu gruplar üzerinde diğer girişim yapan metallere etkisini minimize edecek modifikasyonlara yönelmesi büyük önem arz etmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Adam, V., Zehnalek, J., Petrlova, J., David, P., Sures, B., Trnkova, L. Jelen, F., Vitecek, J, Kizek, R. 2005. Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy metal ion biosensor. *Sensors*, 5; 70-84.
2. Adams, R.N., 1958. Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry*, 30; 1576.
3. Aivasidis, A., Melidis, P., Georgiou, D. 2002. Use of a microbial sensor: A new approach to the measurement of inhibitory effects on the microbial activity of activated sludge. *Bioprocess and Biosystems, Eng.* 25
4. Aksu, Z. and Kutsal, T. 1991. A bioseparation process for removing lead (II) ions from wastewater by using *C. vulgaris*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 52; 109-118.
5. Aksu, Z. and Gülen, H. 2002. Binary biosorption of iron(III) and iron(III)-cyanide complex ions on *Rhizopus arrhizus*: modelling of synergistic interaction. *Process Biochemistry*, 38;161-173.
6. Aksu, Z., Ertuğrul, S. and Dönmez, G. 2009. Single and binary chromium (VI) and Remazol Black B biosorption properties of *Phormidium* sp. *Journal of Hazardous Materials*, 168; 310-318.
7. Aksuner, N., Henden, E., Yılmaz, I., Cukurovali, A. 2009. A highly sensitive and selective fluorescent sensor for the determination of copper(II) based on a Schiff base, *Dyes Pigm.* 83; 211–217.
8. Akyılmaz, E., Yorgancı, E. and Asav, E. 2010. Do copper ions activate tyrosinase enzyme? A biosensor model for the solution. *Bioelectrochem.* 78;155- 160.
9. Alocijila, E.C. and Radke, S.M., 2003. Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, 18; 841-846.
10. Alpat, K., Yüksel, U. Ve Akçay, H. 2005. Development of a novel carbon paste electrode containing a natural zeolite for the voltammetric determination of copper. *Electrochemistry Communications.* 7(2);130-134.
11. Alpat, Ş., Alpat, S.K., Çadircı, B.H., Yaşa, İ., Telefoncu, A. 2008. A novel microbial biosensor based on *Circinella* sp modified carbon paste electrode and its voltammetric application. *Sensors and Actuators B*, 134; 175-181.
12. Arikawa, Y., Ikebukuro K., Karube, I. In: Mulchandani, A., Rogers, K.R. (Eds.). 1998. *Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols*, Humana Press, Totowa, N.J., p. 225.
13. Belkin, S. 2003. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Current Opinion in Microbiology*, 6; 206–212.

14. Bennouna, A., Kheribech, A., Scharff, JB., Chassagneux, F., Durand, B., Vittori, O. 1997. Bioaccumulation and determination of lead using treated-Pennisetum modified caebon paste electrode. *Electrochimica Acta*, 42;26-59.
15. Biran, I., Rissin, D., Ron, E. and D. Walt. 2003. Optical imaging fiber-based live bacterial cell array biosensor. *Analytical Biochemistry*, 315; 106-113.
16. Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E. 1998. *Chemie und Gesundheit "Eineverst 2ndliche Einführung in die Toxikologie"*, VCHVerlagsgesellschaft, ISBN 3-527-26455-8.
17. Blake, I., Pavlov, A., Khosraviani, M., Ensley, H., Kiefer, G., Yu, H., Ji, X., Blake, D. 2004. Novel monoclonal antibodies with specificity for chelated uranium (VI). *Bioconjugate Chemistry*, 15; 1125-1136.
18. Bontidean, I., Lloyd, J.R., Hobman, J.L. Wilson, J.R., Csöregi, E., Mattiasson, B., Brown, N.L. 2000. Bacterial metal-resistance proteins and their use in biosensors for the detection of bioavailable heavy metals. *Inorganic Biochemistry*, 79; 225-229.
19. Brett, A.M. Oliveira, Macedo, T.R.A., Rimundo, D., Margues, M.H., Serrano, S.H.P. 1998. Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 13; 861-867.
20. Brohi, A., Karaman, R. 1995. Azotlu gazların atmosferik dönüşüm olayları ve çevrede yol açtığı olumsuz etkileri. *Ekoloji Dergisi*, 16.
21. Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45; 198-207.
22. Buerk, D.G., 1993. *Biosensors: Theory and Applications*, Technomic Publishing, Lancaster, PA.
23. Carmichael, W.W. 1988. In *Marine Toxins and Venoms, Handbook of Natural Toxins* (Ed: A. T. Tu), Dekker, New York, 3; 121-147.
24. Chang, J.S., Law, R. and Chang, C.C. 1992. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU 21. *Water Research*, 31; 1651-1658.
25. Chen-Huang, C., Chia- Su, C., Hsieh, J.L, Tseng, CP., Lin, P.J., Chang, j.S. 2003. Polypeptides for heavy metal biosorption: capacity and specificity of two heterogeneous MerP proteins, *Enzyme and Microbial Technology*, 33; 379-385.
26. Chouteau, C., Dzyadevych, S., Durrieu, C., Chovelon, J.M. 2004. A bi-enymatic whole cell coductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides in water samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 21; 273-281.
27. Corbisier, P.G., Ji, G.N., Mergeay, M.S. 1993. LuxAB Gene Fusions with the Arsenic and Cadmium Resistance Operons of *Staphylococcus Aureus* Plasmid p1258. *FEMS Microbiology Letters*, 110; 231-238.



28. Corbisier, P., Vander Lelie ,D., Borremans, B., Provoost, A., de Lorenzo, V., Brown, N.L., Lloyd J.L., Hobman, J.L., Csöregi, E., Johansson, G., Mattiason, B. 1999. Whole cell and protein based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Analytical Chemistry Acta*. 387; 235-244.
29. Cowell, D.C., Dowman, A.A., Ashcroft, T. 1995. The detection and identification of metal and organic pollutants in potable water using enzyme assays suitable for sensor development. *Biosensors and Bioelectronics*, 10; 509-516.
30. Daunert, S., Barret, G., Feliciano, J., Shetty, R., Shrestha, S. 2000. Genetically engineered whole cell sensing systems:coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews*, 100; 2705-2738.
31. Deshpande, S.S. and Rocco, R.M., 1994. Biosensors and their potential use in food quality control. *Food Technology*, June; 146-150.
32. D'souza, S.F. 2001. Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16; 337-353.
33. Duffus, H.J., Worth, H.G.J. 1996. *Fundamental toxicology for chemists*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services.
34. Elvina, RO. Jr., Mojica, ERE. 1999. Orange peel essential oil as component of a metal sensor for lead (II) ion determination in aqueous solutions. *Jornal of Applied Science Environment Manage*. 9;23.
35. Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B., Özsöz, M. 1999. Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor. *Electroanalysis*, 11; 1372-1376.
36. Ertuğrul, S., San, N.O. and Dönmez, G. 2009., Treatment of dye (Remazol Blue) and heavy metals using yeast cells with the purpose of managing polluted textile wastewaters. *Ecological Engineering*. 35; 128-134.
37. Favero, N., Costa, P., Massimino, M.L. 1991. In vitro uptake of Cadmium by basidiomycetes (*Pleurotus ostreatus*). *Biotechnology Letters*, 13; 701-704.
38. Flynn, H., Mahon, V., G. Diaz, C. Demergasso, P. Corbisier, A. Mcharg, and G. Paton. 2002. Assessment of Bioavailable Arsenic and Copper in Soils and Sediments from the Antofagasta Region of Northern Chile. *The Science of the Total Environment*, 286; 51-59.
39. Gadd, G.M and Griffiths, A.J. 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity, *Microbial Ecology*, 4; 303-317.
40. Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J. , Gamez, G., Dokken, K. 1999. Effects of chemical competition for multi-metal binding by *Medicago sativa* (alfalfa). *Journal of Hazardous Materials*, 69; 41-51.
41. Garden, S.R., Strachan, N.J.C. 2001. Novel colorimetric immunoassay for the detection of aflatoxin B1. *Analytical Chimica Acta*, 444; 187-191.

42. Gürsoy, O., Kınık, O. and Kavas, G., 2002. Gıda güvenliği ve HACCP kapsamında süt teknolojisi açısından biyosensörlerin değerlendirilmesi. Dünya yayıncılık. GIDA Kasım; 62-68.
43. Hall, E.A.H.1990. Biosensors. Ch: 1 biosensors in context, Open university Press, İngiltere, s;3-30.
44. Holan, Z.R., Volesky, B., Prasetyo, I. 1993. Biosorption of cadmium by biomass of marine algae. *Biotechnology and Bioengineering* 8; 819-825.
45. Honeychurch, KC., Hart, JP., Cowell, DC. 2001. Voltammetric studies of lead at a 1-(2-pyridylazo)-2-naphtol modified screen printed carbon electrode and its trace determination in water by stripping voltammetry, *Anal. Chim.* 431;89.
46. Ivask, A., Virta, M., Kahru, A. 2002. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil *Soil Biology and Biochemistry*, 34; 1439-1447.
47. Jang, L.K., Lopez, S.L. Eastman, S.L. and Pryfogle, P. 1991. Recovery of Cu (II) and cobalt by biopolymer gels. *Biotechnology and Bioengineering*, 37; 266-273 s.
48. Junhui, Z., Hong, C. and Ruifu, Y., 1997. DNA based biosensors. *Biotechnology Advances*, 15; 43-58.
49. Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2004. Metallerin Çevresel Etkileri-I. *Metalurji Dergisi*, 136; 47-53
50. Kirowa-Eisner, E., Brand, M., Tzur, D., 1999. Determination of sub-nanomolar concentrations of lead by anodic-stripping voltammetry at the silver electrode. *Analytical Chimica Acta.* 385; 325-335.
51. Kizek, R., Vacek, J., Trnkova, L. Klejdus, B., Kuban, V. 2003. Electrochemical biosensors in agriculture and environmental analysis. *Chemicke. Listy*, 97; 1003.
52. Khosraviani, M., Pavlov, A., Flowers, G., Blake, D. 1998. Detection of heavy metals using immunoassay: Optimization and validation of a rapid, portable assay for ionic Cd. *Environmental Science Technology*, 32; 137-142.
53. Kröger, S., Law, R.J. 2005. Biosensors for marine applications. We all need the sea, but does the sea need biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2; 1903-1913.
54. Lehmann, M., Riedel, K., Adler, K., Kunze, G. 2000. Amperometric measurement of copper ions with a deputy substrate using a novel *Saccharomyces cerevisiae* sensor, *Biosens. Bioelectron.* 15;211–219.
55. Lei, Y., Chen, W., Mulchandani, A. 2006. Microbial Biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 568; 200-210.

56. Lin, C.C. and Lai, Y.T. 2006. Adsorption and recovery of lead (II) from aqueous solutions by immobilized *Pseudomonas aeruginosa* PU21 beads. *Journal of Hazardous Materials*, 137; 99- 105.
57. Lu, Y., Liu, J., Brueshoff, P., Pavot, C., Brown, A. 2003. New highly sensitive and selective catalytic biosensors for metal ions. *Biosensors and Bioelectronics*, 18; 529-540.
58. Luong, J. H. T., Bouvrette, P. and Male, K. B., 1997. Developments and applications of biosensors in food analysis. *TIBTECH* September 15; 369-377.
59. Mahendra, N., Gangaiya, P., Sotheeswaran, S., Narayanaswamy, R. 2003. Investigation of a fibre optic copper sensor based on immobilised  $\alpha$ -benzoinoxime (cupron), *Sens.Actuators B Chem.* 90; 118–123.
60. Malik, A. 2004. Metal Bioremediation through growing cells. *Environmental International*. 30; 261-278.
61. Malitesta, C. and Guascito, M.R. 2005. Heavy metal determination by biosensors based on enzyme immobilised by electropolymerisation. *Biosensors and Bioelectronics*, 20; 1643-1647.
62. Mamieieva, O.H., Kasatkina, T.P. ve Lavrinchuk V.Ia. 2007. Biosorption ability of mutants of *Rhodotorula mucilaginosa* UCM Y-1776. *Mikrobiol Z*, 69(2);29-35.
63. Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, J. M., Moo-Young, M. and Luong, J. H., 2000. Fiber-optic biosensors-Trends and advances. *Analytical Science* 16; 677-692.
64. Mello, L. D. and Kubota, L. T., 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77; 237-256.
65. Michel, C., Ouerd, A., Brunet, F.B., Guigues, N., Grasa, J.P., Bruschi, M., Ignatiadis, I. 2006. Cr(VI) quantification using an amperometric enzyme-based sensor: Interference and physical and chemical factors controlling the biosensor response in ground waters. *Biosensors and Bioelectronics*, 22; 285-290.
66. Mikkelsen, S.R. 1996. Electrochemical biosensor for DNA sequence detection a review. *Electroanalysis*, 8; 15-19.
67. Mojica, E.R.E., Vidal, J.M., Pelegrina, A.B., and Micor, J.R.L. 2007. Voltammetric determination of lead (II) ions at a carbon paste electrode modified with banana tissue. *Journal of Applied Sciences*, 7; 128-129.
68. Mulchandani, A., Rogers, K.R. 1998. *Enzyme and Microbial biosensors: Techniques and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ.
69. Naja, G., Mustin, C., Berthelin, J., Volesky, B., 2005. Lead biosorption study with *Rhizopus arrhizus* using a metal-based titration technique. *Journal of Colloid and Interface Science*, 292, 537-543.

70. Newbury, D.E., Fiori, C.E., Marinenko, R.B., Myklebust, R.L., Swyt, C.R. and Bright, D.S. 1990. Compositional mapping with the electron probe microanalyzer: Part II", *Analytical Chemistry*, 62; 1245A-1254.
71. Nielsen F.M., Utley, J.H.P. 2001. *Organic electrochemistry*, 4th ed. H. Lund and O. Hammerich, Eds. Marcel Dekker, New York.
72. Nies, D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27; 313-339.
73. Özsöz, M., 2005. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri. Gıda kongresi (19-21 Nisan 2005 Bornova, İzmir) Sözlü bildiriler s; 266-273.
74. Peitzsch, N., Eberz, G., Nies, D.H. 1998. *Alcaligenes eutrophus* as a Bacterial Chromate Sensor. *Applied of Environmental Microbiology*, 64; 453-458.
75. Pérez Silva RM, Abalos Rodríguez A, Gómez Montes De Oca JM, Cantero Moreno D. 2009. Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. *Bioresource Technology*, 100; 1533-8.
76. Petanen, T., and M. Romantschuk. 2002. Use of Bioluminescent Bacterial Sensors as an Alternative Method for Measuring Heavy Metals in Soil Extracts. *Analytical Chimica Acta*, 456; 55-61.
77. Petanen, T., and M. Romantschuk. 2003. Toxicity and Bioavailability to Bacteria of Particle-Associated Arsenite and Mercury. *Chemosphere*, 50; 409-413.
78. Petersen, A.T., Hosbond, C., Nybroe, O. 2001. Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 38; 59-67.
79. Prodromidis, M. I. and Karayannis, M., 2002. Enzyme based amperometric biosensors for food analysis. *Electro analysis*, 14; 241-261.
80. Ramanathan, S. Ensor, M., Daunert, S. 1997. Bacterial biosensors for monitoring toxic metals. *Trends in Biotechnology*, 15; 500-506.
81. Rensing, C. and R.M. Maier. 2003. Issues underlying use of biosensors to measure metal bioavailability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56; 140-147.
82. Rether, A. 2002, Doktora Tezi, Münih Teknik Üniversitesi, Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher. Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen.
83. Rodriguez, B.B., Bolbot, J.A., Tothill, I.E. 2004. Development of urease and glutamic dehydrogenase amperometric assay for heavy metals screening in polluted samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 19; 1157-1167.

84. Sağ, Y., Kutsal, T., 1997. The simultaneous biosorption process of lead(II) and nickel(II) on *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*. 32; 591-597.
85. Sağlam, N., Cihangir, N. 1995. Ağır metallerin biyolojik s¼reçlerle biyosorbsiyonu çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Eitim Fak¼ltesi Dergisi, 11; 157-161p.
86. Scott, J.A. and Karonjkar, A.M. 1992. Repeated cadmium biosorption by regenerated. *Enterobacter aerogenes* biofilm sattached to activated carbon,. *Biotechnology Letters* 14; 737-740.
87. Shannon, RD. 1976. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides, *Acta Crystallographica Section A*, 32;751-767.
88. Shravan, K.C.H., Sivarama, S.Y. and Moran M.P. 1992. Use of wild type and nickel resistant *Neurospora crassa* for removal of Ni<sup>+2</sup> from aqueous medium. *Biotechnology Letters*. 14; 1099-1202.
89. Sures, B., 2004. Environmental Parasitology: Relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology*, 20; 170.
90. řeng¼l, F. 1991. End¼striyel atıksuların ¼zellikleri ve arıtılması, Dokuz Eyl¼l niversitesi, Mimarlık ve M¼hendislik Fak¼ltesi Basımevi nitesi (İzmir) 1-365 s.
91. Tag, K., Riedel, K., Bauner, HJ., Hanke, G., Baronian, KHR., Kunze, G. 2007. Amperometric detection of Cu<sup>2+</sup> by yeast biosensors using flow injection analysis (FIA), *Sens.Actuators B Chem.* 122; 403–409.
92. Taştan, B.E., Ertuğrul, S. and D¼nmez, G. 2010. Effective bioremoval of reactive dye and heavy metals by *Aspergillus versicolor*. *Bioresource Technology*. 101; 870-876.
93. Tauriainen S., Karp, M., Chang, W., Virta, M. 1997. Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. *Applied Environmental Microbiology*, 63; 4456-4461.
94. Tauriainen S., Virta, M. And M. Karp. 2000. Detecting Bioavailable Toxic Metals and Metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria. *Water Research*, 34; 2662-2666.
95. Telefoncu, A., 1999. Biyosensörler. Biyokimya lisans¼st¼ yaz okulu 20-26 Haziran 1999 Kuşadası, T¼rkiye. Ege Üniversitesi Fen Fak¼ltesi Baskı At¼lyesi. s; 1-9.
96. Tibazarwa C, Corbisier P, Mench M, Bossus A, Solda P, Mergeay M, Wyns L, van der Lelie D. 2001. A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environmental Pollution* 11; 19-26.
97. Ting, Y.P., Lawson, F. and Prince, J.G. 1991. Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris* II Multi- ion stiation, *Biotechnology and Bioengineering*, 37; 445-455.
98. Tsezos, M., Volesky, B. 1981. Biosorption of Uranium and Thorium. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(3);583-604.

99. Turner, A.P.F., 1987. Biosensors: fundamentals and applicaitons. Oxford University Press, İngiltere, s; 5-7.
- 100.Turpeinen R., Virta M., and Haggblom, M. 2003 .Analysis of Arsenic Bioavailability in Contaminated Soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22; 1-6.
- 101.Tzoris, A.,Fernandez-Perez, V., Hall, E.A.H. 2005. Direct toxicity assessment with a mini portable respirometer. *Sensors and Actuators B*, 105; 39.
- 102.Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Özsöz, M., Beglieter, A., Mowat, M. 1997. Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance. *Analytical Chemistry*, 69; 5200-5202.
- 103.Woolever, C.A. and Dewald, H.D. 2001. Differential pulse anodic stripping voltammetry of barium and lead in gunshot residues, *Forensic Sci. Int.* 117;185.
- 104.Wong, P.K. and Kwok, S.C. 1992. Accumulation of Ni (II) ion by immobilized cells of *Enterobacter* species, *Biotechnology Letters* 14; 629-634.
- 105.Velasco-Garcia, M. N. and Mottram, T., 2003. Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering* 84; 1-12.
- 106.Villegas LB., Amoroso MJ., de Figueroa LI. 2005. Copper tolerant yeasts isolated from polluted area of Argentina. *J Basic Microbiol.*, 45(5);381-91.
107. Villegas LB., Amoroso MJ., de Figueroa LI ve Faustino FS. 2009. Cu(II) removal by *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11 in sequential batch cultures. *Water Science and Technology*, 60(5);1225-1232.
- 108.Volesky, B., May, H. and Holan, Z.R. 1993. Cadmium biosorbption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 41; 826-289.
- 109.Yin, J., Wei, W., Liu, X., Kong, B., Wu, L., Gong, S. 2007. Immobilization of bovine serum albumin as a sensitive biosensor fort he detection of trace lead ion in solution by piezoelectric quartz crystal impedance. *Anal. Biochem.* 360;99.
- 110.Yuce, M., Nazır, H., Dönmez, G. 2010. An advanced investigation on a new algal sensor determining Pb(II) ions from aqueous media. *Biosensors&Bioelectronics*. 26(2);321-326.
- 111.Zlatev, R., Magnin, J.P., Ozil, P., Stoycheva, M. 2006. Bacterial sensors based on *Acidithiobacillus ferrooxidans* Part II. Cr (VI) determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(8); 1501-1506.
- 112.<http://www.bsm.gov.tr/makale/20018.asp?sayi=20018>
- 113.<http://www.unisense.com>
- 114.<http://www.cheng.cam.ac.uk/research/groups/electrochem/JAVA/electrochemistry/EL-EC/I4html/cv.html>

115.<http://www.webelements.com/>

## ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Muş'un Bulanık ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Muş'un Bulanık ilçesinde, lise öğrenimini Van Kazım Karabekir Lisesi'nde birincilikle tamamladı. 2000 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2004 yılında, bölüm birincisi ve fakülte üçüncüsü olarak mezun oldu. 2004 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Orta Öğretim Alan Öğretmenliği Biyoloji Bölümü'nden 2005 yılı Haziran ayında mezun oldu. Aynı sene içinde Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda başladığı Yüksek Lisansını 2006 yılında tamamladı ve aynı yıl içerisinde aynı enstitüde doktorasına başladı. 2010 Eylül-2011 Mart tarihleri arasında Cambridge Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Kimya mühendisliği ve Biyoteknoloji Bölümünde altı ay süreyle bir projede akademik ziyaretçi ünvanı ile çalıştı. 2011 yılı Haziran ayında İngiltere' de kazandığı deneyimlerini paylaşmak üzere Ürdün'de MONOJO isimli Biyoteknoloji firmasında bir ay boyunca davetli olarak görev yaptı. Yüksek lisansı ve Doktorası süresince Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (TÜBİTAK-BİDEB) bursu aldı.